



ФБУН ГНЦ ВБ "ВЕКТОР"



ИННОВАЦИОННЫЙ
ЦЕНТР КОЛЬЦОВО



НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО



БИОТЕХНОПАРК
КОЛЬЦОВО



БИОФАРМ



OPEN
BIO

ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ
КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

**VII МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ: ВИРУСОЛОГОВ,
БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ
БИОЛОГОВ И БИОФИЗИКОВ**

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО - 2020



НОВОСИБИРСКИЙ ОБЛАСТНОЙ
ИННОВАЦИОННЫЙ ФОНД

N* Новосибирский
государственный
университет
*НАСТОЯЩАЯ НАУКА

apteka.ru

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

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2020

УДК 577.2:62.01:578+(001)

ББК 28.07:30.16:28.4

М431

М431 VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2020: сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2020. — 642 с.

ISBN 978-5-4437-1114-0

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-2020.

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 978-5-4437-1114-0

© АНО «Инновационный центр
Кольцово», 2020

раздел 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПАСЛЕНА ЧЕРНОГОСЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ ПИЩЕВОГО КОНСЕРВАНТА

STUDY OF THE PROPERTIES AND CHEMICAL COMPOSITION OF BLACK NIGHTSHADE (*SOLANUM NIGRUM* L.) FOR THE DEVELOPMENT OF FOOD PRESERVATIVE

О. В. Астафьева, З. В. Жаркова

Астраханский государственный медицинский университет

O. V. Astafyeva, Z. V. Zharkova

Astrakhan State Medical University

E-mail: astra39@list.ru

Аннотация

Паслен черный (*Solanum nigrum* L.) — малоизученный объект в нашей стране, но нашедший широкое применение в других странах. Целью работы было исследование химического состава, антибактериальных и антиоксидантных свойств экстрактов *S. nigrum* для разработки пищевого консерванта.

Abstract

Black nightshade (*Solanum nigrum* L.), a few studied object in our country, but which has found wide application in other countries. The aim of this work was to study the chemical composition, antibacterial and antioxidant properties of *S. nigrum* extracts for the development of a food preservative.

Plants are one of the sources of antimicrobial and antioxidant substances that can be used as preservatives.

The object of this work was *S. nigrum*, which is few studied and not used in Russia.

Extraction of biologically active substances was carried out with water and 70 % alcohol from the roots, stems and roots of *S. nigrum*. Then the extractants were evaporated by a rotary vacuum evaporator.

The antibacterial activity was studied by the agar diffusion method and by the method of serial dilutions. Antioxidant activity was determined by DPPG test.

By chromatographic methods (TLC, HPTLC, HPLC), compounds such as quercetin, aspartic, fumaric, pyruvic, acetic, citric, and succinic acids were identified, which most likely cause antibacterial and antioxidant properties.

The aqueous extracts of the stems had the highest antibacterial activity, but did not have an antioxidant effect. Hydroalcoholic extracts of the leaves had high antioxidant activity, but relatively low antibacterial activity. The optimal composition of extracts of leaf and stem of *S. nigrum* with preserving properties is a composition consisting of an aqueous extract of the stem, ethanol (70 %) extracts of the stem and leaves in a ratio of 1: 1: 1, respectively. This composition showed high both antibacterial and antioxidant activity.

The results obtained are the basis for the development of a food preservative based on the compositions of *S. nigrum* extracts.

ОПЫТ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНАТОРА В КИТАЕ*

EXPERIENCE OF CREATING A HIGH-THROUGHPUT SEQUENCER IN CHINA

П. К. Афоничева, Д. А. Белов, Ю. В. Белов, А. А. Евстрапов

Институт аналитического приборостроения Российской академии наук

P. K. Afonicheva, D. A. Belov, Yu. V. Belov, A. A. Evstrapov

Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences

E-mail: polina.afonicheva@gmail.com

Аннотация

В последние годы в России значительные материальные ресурсы были направлены на обеспечение независимости от зарубежных поставщиков в области высокопроизводительного секвенирования, а также на достижение лидирующих позиций на мировом рынке. Целью настоящего исследования является опыт китайских организаций в попытке войти в список передовых компаний среди разработчиков высокопроизводительных секвенаторов. Рассмотрены модели секвенаторов китайского производства как выпускаемые по лицензионным соглашениям, так и собственной разработки.

Abstract

In recent years significant material resources in Russia have been used to ensure independence from foreign suppliers in high-throughput sequencing, as well as to achieve a leading position in the world market. The aim of this research is the experience of Chinese organizations in an attempt to become one of the leading companies among the high-throughput sequencer developers. Models of Chinese-made sequencers are considered.

Высокопроизводительное секвенирование (Next Generation Sequencing, NGS), вытеснившее классический метод секвенирования по Сэнгеру в задачах анализа полного генома, экзона и транскриптома за счет снижения стоимости и трудоемкости анализа, занимает более половины объема ми-

© П. К. Афоничева, Д. А. Белов, Ю. В. Белов, А. А. Евстрапов, 2020

* Работа выполнена по Государственному заданию № 075-01073-20-00.

рового рынка и консолидирован вокруг американских компаний Illumina и Thermo Fisher Scientific. Не меньший интерес представляют компании Китая, способные потеснить лидеров.

Ряд NGS секвенаторов, произведенных в Китае по лицензии от других компаний, схож по характеристикам с зарубежными аналогами:

- NextSeq CN500 (Berry Genomics) и NextSeq 550AR (Annoroad Gene Technology) — аналоги NextSeq 500 (Illumina);
- BioelectronSeq 4000 (Boao Biological Group), использующий технологию Ion Torrent;
- DA8600 (Daan Gene) — аналог IonProton;
- два секвенатора компании BGI Genomics: BGISEQ-100, основанный на технологии Ion Torrent, и BGISEQ-1000, основанный на технологии cPAL от Complete Genomics.

Пять китайских компаний заявляют о разработке своих собственных секвенаторов.

Секвенатор BIGIS компании Zixin Pharmaceutical Industrial, основанный на устаревшей технологии 454, имеет мало шансов на выход даже на китайский рынок.

Одномолекулярный секвенатор GenoCare 1600 Single Molecular Sequencer компании GeneMind Biosciences Company Limited успешно прошел клинические испытания в 2019 году, обладает оригинальными решениями и может выйти на рынки NGS.

Секвенатор НУК-PSTAR-IIА компании Huayinkang Gene Technology использует технологию, аналогичную технологии SOLiD, которая не применяется в современных секвенаторах, но имеет некоторые преимущества по сравнению с ними. Компания утверждает о наличии оригинальных решений, однако факты применения НУК-PSTAR-IIА за пределами Китая отсутствуют.

Компания Anxun Biotechnology (Axbio) заявляет о разработке нанопорового секвенатора AXP100. Информация о результатах его применения отсутствует, что ставит под сомнение готовность устройства.

Компания BGI Genomics выпускает секвенаторы DNBSEQ-400, DNBSEQ-50, DNBSEQ-T7 и DNBSEQ Tx, которые широко используются и не уступают аналогам. Однако у компании, несмотря на их утверждения о патентной чистоте применяемых технических решений, есть проблемы с выходом на рынки Европы и Северной Америки.

Анализ опыта китайских компаний показал, что для удовлетворения собственных нужд страны целесообразно производство секвенаторов на основе известных методов, однако для выхода на мировой рынок необходимо создание оригинальных технологий.

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В СОЧЕТАНИИ
СНАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ СМАРТ-СКАФФОЛДАМИ
КАКИНСТРУМЕНТ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ***

**STEM CELLS IN COMBINATION WITH NANOSTRUCTURED SMART-
SCAFFOLDS AS A TOOL FOR BONE TISSUE REGENERATION**

Ф. С. Ахатова, Е. А. Науменко, И. Д. Гурьянов, Р. Ф. Фахруллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет

F. S. Akhatova, E. A. Naumenko, I. D. Guryanov, R. F. Fakhrullin

Kazan (Volga Region) Federal University

E-mail: akhatovaf@gmail.com

Аннотация

Стволовые клетки взрослого организма обладают потенциалом в формировании костной ткани и могут быть использованы для ее регенерации, например, при травмах опорно-двигательного аппарата. Матрицы на основе биополимеров в сочетании с наноматериалами могут использоваться как эффективные носители для стволовых клеток и ускорять регенеративные процессы.

Abstract

Adult stem cells have the potential to form bone tissue and can be used for its regeneration, for example, in injuries of the musculoskeletal system. Matrices based on biopolymers in combination with biocompatible nanomaterials can be used as effective carriers for stem cells and accelerate regenerative processes.

Modern advances in stem cell biology open up opportunities for creating new approaches to the treatment of a number of diseases, including diseases of the musculoskeletal system, both caused by dysfunctions of the body's metabolic systems and resulting from trauma. These areas, suggesting a personalized approach to therapy and surgery, can include cell replacement therapy, drug therapy, or

© Ф. С. Ахатова, Е. А. Науменко, И. Д. Гурьянов, Р. Ф. Фахруллин, 2020

* The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University. This study was funded by Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Republic of Tatarstan (grant #18-415-160010).

a combination of both. The main idea is to stimulate the body's own regenerative abilities by promoting survival, proper migration, proliferation and differentiation of endogenous progenitor stem cells. In addition, to increase their own pool of progenitor cells, they can be introduced from the outside. The creation of cell grafts to replace bone tissue defects and their effective engraftment in patients is an urgent problem in regenerative medicine. Despite its relative strength, bone tissue is susceptible to destruction as a result of trauma, genetically determined pathological fragility due to a deficiency of organic matter and resorption. Successful bone repair is possible only in the presence of high titers of mesenchymal stem cells. To create a sufficient pool of stem cells in the area of a bone tissue defect, it is promising to apply them on 3D biopolymer carriers, the composition and mechanical properties of which can be modulated by using various types of polymers, dopants, including nanomaterials, and by methods of matrix formation. At present, matrices have been developed based on various polymers, both artificial and natural, suitable for transplantation. A promising approach to matrix formation is the use of nanomaterials. Biocompatible halloysite nanotubes were used as a nanomaterial to modulate the properties of composite matrices. The nanotubes were loaded with small molecules (forskolin) to accelerate the differentiation of stem cells in the bone direction. The gradient distribution of nanoparticles within the matrix allowed us to simulate the microenvironment of stem cells closer to the native one. It was revealed that the growth of mesenchymal stem cells for 14–20 days on gradient matrices led to a spontaneous transition of cells to differentiation in the bone direction. Further, the matrices we developed were used for implantation into the area of bone defects with subsequent analysis of the rate of matrix degradation, the release of nanotubes into the surrounding tissues, and the formation of blood vessels. The release of halloysite nanotubes into the surrounding tissues was recorded using enhanced dark-field microscopy and it was shown that the nanotubes remain in the surrounding tissue without the formation of any histological changes.

**РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ
АНТИБИОТИКОВ: СВОЙСТВА ИММУНОРЕАГЕНТОВ
И ВЫБОР ФОРМАТА АНАЛИЗА ***

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TESTS
FOR ANTIBIOTICS DETECTION: PROPERTIES OF IMMUNOREACTANTS
AND CHOICE OF ANALYSIS FORMAT

A. V. Bartosh, D. V. Sotnikov, O. D. Hendrickson, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev

*Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

A. V. Bartosh, D. V. Sotnikov, O. D. Hendrickson, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev

Research Center of Biotechnology RAS, Moscow

E-mail: bartoshlab@yandex.ru

Аннотация

Исследованы особенности одновременного проведения в потоке на мембранном носителе нескольких иммунохимических взаимодействий для реализации мультиплексного иммунохроматографического анализа. Работа выполнена с использованием антител, специфичных к антибиотикам разных классов, конъюгатов гаптен-белок в качестве реагентов, конкурирующих с антигенами в пробе за связывание с антителами, и наночастиц золота в качестве маркера. Для иммунореагентов, специфичных к стрептомицину, тетрациклину, хлорамфениколу и линкомицину определены равновесные константы связывания. Сопоставлены варианты с разной продолжительностью взаимодействий, определяемой расположением зон связывания на мембране; охарактеризовано влияние этого параметра на интенсивность регистрируемого оптического сигнала и пределы обнаружения (ПрО) аналитов. Показано, что часть иммунореагентов нечувствительна к этому варьированию, тогда как для других наблюдались 5–50-кратные отличия ПрО. В оптимальной тест-системе для одновременной детекции четырех антибиотиков ПрО линкомицина, хлорамфеникола, стрептомицина и тетрациклина составили 0,4; 0,01; 4 и 1 нг/мл соответственно.

© А. В. Бартош, Д. В. Сотников, О. Д. Гендриксон, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев, 2020

* Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-08-01397).

Abstract

The features of simultaneous carrying out of several immunochemical interactions in a flow on a membrane for the implementation of multiplex immunochromatographic analysis have been investigated. The work was implemented using antibodies specific to antibiotics of different classes, hapten-protein conjugates as reagents, competing with antigens in the sample for binding to antibodies, and gold nanoparticles as a marker. Equilibrium binding constants were determined for immunoreagents specific to streptomycin, tetracycline, chloramphenicol and lincomycin. Variants with different duration of interactions determined by the location of binding zones on the membrane were compared; the effect of this parameter on the intensity of the recorded optical signal and the limits of detection (LOD) of analytes was characterized. It was shown that some of the immunoreagents are insensitive to this variation, while for others there were 5–50-fold differences in the LODs. In the optimal test system for the simultaneous detection of four antibiotics, the LODs of lincomycin, chloramphenicol, streptomycin, and tetracycline were 0.4; 0.01; 4, and 1 ng/ml, respectively.

Задача исследования состояла в изучении аналитических параметров пар иммунореагентов в мультиплексном иммунохроматографическом анализе (ИХА). Интеграция нескольких монопараметрических тест-систем в мультиплексную тест-систему связана с несколькими существенными проблемами. Проведение реакций между реагентами разной специфичности на одной тест-полоске требует изменения положения зон связывания для разных аналитов и, соответственно, условий взаимодействия для них. Прежде всего изменяется продолжительность взаимодействия реагентов в растворе, когда меченые антитела и компоненты пробы перемещаются к зоне связывания. Скорость движения потока, замедляющаяся с увеличением расстояния от старта, и изменение концентраций реагентов существенно влияют на чувствительность анализа и степень связывания метки (и, соответственно, на достоверность визуальной оценки получаемых результатов). Данная ситуация требует рассмотрения отличий моно- и мультипараметрического ИХА, выявления оптимального расположения зон связывания и его зависимости от характеристик иммунных взаимодействий. Количество возможных расположений резко возрастает с ростом количества зон связывания (N) и равно $N!$ (т. е. 24 для четырех аналитов). Поэтому трудоемкая проверка всех вариантов должна быть заменена простыми методиками оценки отдельных реагентов.

Исследование проводилось для систем детекции антибиотиков — опасных для здоровья контаминант пищевой продукции животного происхождения. Для отобранных иммунореагентов определены равновесные константы связывания антиген-антитело, составившие $5,5 \times 10^{11}$, $4,5 \times 10^{11}$,

$4,1 \times 10^{11}$ и $2,9 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ для тетрациклина, линкомицина, хлорамфеникола и стрептомицина соответственно. Синтезированы конъюгаты наночастиц золота со специфическими и антивидовыми антителами для реализации ИХА; охарактеризованы их размеры и состав. Изучено влияние расположения зон связывания на параметры детекции каждого из антибиотиков. Рассмотрены три положения аналитической зоны (4, 11,5 и 19 мм от старта); показано, что предел детекции и рабочий диапазон анализа определяются расстоянием от края рабочей мембраны до зоны иммобилизации конъюгатов гаптен — белок, т. е. продолжительностью взаимодействия иммунореагентов (в том числе вследствие замедления скорости потока). Установлены сочетания иммунореагентов, чувствительные и нечувствительные к этому варьированию расстояния. Охарактеризованы интенсивность окрашивания аналитической зоны в отсутствие аналита в пробе и ПрО для разных антибиотиков в зависимости от положения зоны связывания на тест-полоске. Показано, что отличия ПрО для оптимального и неоптимального положения могут составлять от 5 до 50 раз. С учетом характеристик различных пар иммунореагентов реализованы варианты мультиплексного ИХА для одновременного определения трех и четырех антибиотиков. ПрО в системах с оптимальным расположением зон связывания составили 0,4; 0,01; 4 и 1 нг/мл для линкомицина, хлорамфеникола, стрептомицина и тетрациклина соответственно. Продолжительность ИХА — 10 минут. Данные параметры обеспечивают эффективность практического применения разработанных тест-систем.

СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОМАРКЕРА MIA БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ *

BIOLUMINESCENT MICROANALYSIS TO DETECT MIA TUMOR MARKER

Е. Е. Башмакова, А. Н. Кудрявцев, Л. А. Франк

Институт биофизики СО РАН, Красноярск

E. E. Bashmakova, A. N. Kudryavtsev, L. A. Frank

IBP SB RAS, Krasnoyarsk

E-mail: bashmakovae@ibp.ru

Аннотация

Предложен вариант конкурентного биолюминесцентного иммуноанализа для выявления онкомаркера MIA (белка с меланома-ингибирующей активностью). Получены высокоочищенные препараты рекомбинантного MIA и его гибрида с Ca^{2+} -регулируемым фотопротеином обелином и охарактеризованы как основные элементы аналитической системы. Проведены успешные эксперименты по выявлению MIA в модельных образцах разработанным иммуноанализом.

Abstract

A variant of competitive bioluminescent immunoassay for the detection of the tumor marker MIA (melanoma inhibitory activity protein) has been proposed. The recombinant MIA and the hybrid protein MIA- Ca^{2+} regulated photoprotein obelin have been obtained and characterized as key elements of the analytical system. Experiments to detect MIA in model samples have been successfully carried out, and the prospect of the proposed analytical approach has been shown.

Своевременная диагностика одного из самых агрессивных типов рака — меланомы кожи — является актуальной проблемой современной клинической онкологии. Белок с меланома-ингибирующей активностью MIA (Melanoma Inhibitory Activity protein) ассоциирован с прогрессированием

© Е. Е. Башмакова, А. Н. Кудрявцев, Л. А. Франк, 2020

* Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта президента РФ для молодых ученых — кандидатов наук МК-772.2020.4.

меланомы и выступает в роли раннего индикатора терапевтического ответа для оценки новых меланома-ингибирующих препаратов. В настоящее время для определения уровня МІА в сыворотке или плазме крови существует ряд импортных иммуоферментных наборов сэндвич-типа на основе колориметрической детекции с использованием пероксидазы хрена в качестве репортера. Ни один из них не предназначен для клинического применения. Отечественных аналитических систем для определения уровня МІА в настоящее время нет. Низкое пороговое значение МІА в сыворотке (6,5–9,4 нг/мл) обуславливает высокие требования к чувствительности анализа по его выявлению.

Ранее нами было показано, что биолюминесцентный анализ на основе Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина обелина обеспечивает чувствительность, сравнимую с таковой радиоизотопного анализа.

В ходе работы были созданы различные варианты генетических конструкций, кодирующих рекомбинантный белок МІА, его гибридный вариант МІА-обелин, и получены высокоочищенные препараты этих белков экспрессией в *E. coli* с последующей хроматографической очисткой. Химическим синтезом получен конъюгат фотопротеина обелина с антителами к МІА.

В модельном анализе сэндвич-типа показано, что молекулы полученного рекомбинантного МІА распознаются соответствующими антителами в условиях твердофазного иммуоанализа сэндвич-типа (см. рисунок, а), в том же диапазоне концентраций, что и коммерческий МІА, обладающий биологической активностью.

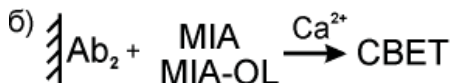
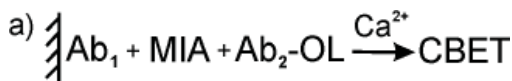


Схема биолюминесцентного иммуоанализа белка МІА,
 где а — биолюминесцентный иммуоанализ МІА сэндвич-типа;
 б — конкурентный иммуоанализ МІА. Ab_1 , Ab_2 — коммерческие антитела к МІА;
 $\text{Ab}_2\text{-OL}$ — химический конъюгат обелина с антителами к МІА;
 MIA-OL — гибридный белок МІА-обелин

Показано, что гибридный белок МІА-обелин обладает Ca^{2+} -зависимой биолюминесцентной активностью обелина, близкой к таковой обелина ди-

кого типа. Домен МІА в составе гибрида распознается соответствующими антителами, что показано твердофазным иммуноанализом. Таким образом, оба полученных рекомбинантных белка могут конкурировать за связывание с анти-МІА антителами в разрабатываемом микроанализе.

Модельный анализ МІА конкурентного типа проводили по схеме, представленной на рисунке, б. Полученный биолюминесцентный сигнал был обратно пропорционален концентрации рекомбинантного МІА в диапазоне от 2,5 нг/мл до 2500 нг/мл, что включает диагностически важный интервал.

НОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ PLGA С ХЛОРИНОМ E6 ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

NOVEL PLGA NANOPARTICLES WITH E6 CHLORINE FOR PHOTODYNAMIC THERAPY

В. А. Бегановская¹, М. Б. Сокол², Н. Г. Яббаров^{2,3},
М. Р. Молляева², М. В. Фомичёва², И. С. Худяева⁴,
Д. В. Белых⁴, О. М. Старцева⁵, Е. Д. Никольская^{2,3}

¹ *Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева, Москва*

² *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*

³ *Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва*

⁴ *Институт химии Коми НЦ УрО РАН*

⁵ *Сыктывкарский государственный университет
им. Питирима Сорокина*

V.A. Beganovskaya¹, M.B. Sokol², N.G. Yabbarov^{2,3},
M.R. Mollayeva², M.V. Fomicheva², I.S. Khudyaeva⁴,
D. V. Belykh⁴, O. M. Startseva⁵, E. D. Nikolskaya^{2,3}

¹ *D. Mendeleev University, Moscow*

² *IBCP RAS, Moscow*

³ *Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow*

⁴ *Institute of Chemistry Komi SC UB RAS*

⁵ *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
«Pitirim Sorokin Syktyvkar State University»*

E-mail: elenanikolskaja@gmail.com

Аннотация

Фотодинамическая терапия применяется для лечения злокачественных новообразований с помощью фотосенсибилизаторов, в качестве которых часто применяются хлорин е6 (XL). Получение наночастиц PLGA, содержащих новые аналоги XL, позволит увеличить эффективность и уменьшить побочные эффекты терапии. Были получены наночастицы с производными XL, проведен анализ их свойств, лучшие

наночастицы обладали диаметром 182 нм, доказали сохранение свойств субстанции и ее пролонгированное высвобождение за 120 ч.

Abstract

Photodynamic therapy is used to treat malignant neoplasms using photosensitizers, which are often chlorin *e6* (XL). Obtaining PLGA nanoparticles containing new analogs of XL will increase the effectiveness and reduce the side effects of therapy. Nanoparticles with XL derivatives were obtained, an analysis of their properties was carried out, the best nanoparticles were 182 nm in diameter, and the preservation of the properties of the substance and its prolonged release in 120 h were proved.

Метод фотодинамической терапии основан на применении фотосенсибилизаторов (ФС) — веществ, чувствительных к свету, например хлорин *e6*, и лазерного излучения с длинной волны, соответствующей максимуму поглощения ФС. Однако ФС обладают рядом недостатков, таких как темновая токсичность, гидрофобность, низкая селективность действия. С целью увеличения эффективности действия и снижения побочных эффектов получают различные системы доставки ФС. Наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) широко применяются в этих целях, поскольку частицы с размером менее 250 нм способствуют пассивному транспорту ФС в поврежденные органы, а контролируемое высвобождение инкапсулированных ФС обеспечивает пролонгированный эффект.

Были получены полимерные частицы с оригинальными производными XL (рис. 1) и определены их физико-химические характеристики (рис. 2).

Наночастицы были получены методом одинарного эмульгирования. В качестве полимера использовали PLGA-COOH 50/50, стабилизатора эмульсии — поливиниловый спирт. Соотношение органической фазы к водной составило 1:10, как и ФС к полимеру.

Наилучшими характеристиками обладали наночастицы NP-XL-2 (см. рис. 2). Средний диаметр частиц составил 182 нм, PDI 0,129, что соответствует критериям пассивного транспорта полученных частиц в опухолевые ткани. По спектру NP-XL-2 можно сделать вывод о сохранении свойств субстанции XL-2 после включения в полимерную матрицу (рис. 3, B). Изучение кинетики высвобождения XL-2 из наночастиц показало наличие двухфазного профиля релиза и высвобождение около 70 % субстанции за 120 ч (рис. 3, Г), что подтверждает наличие пролонгированного эффекта.

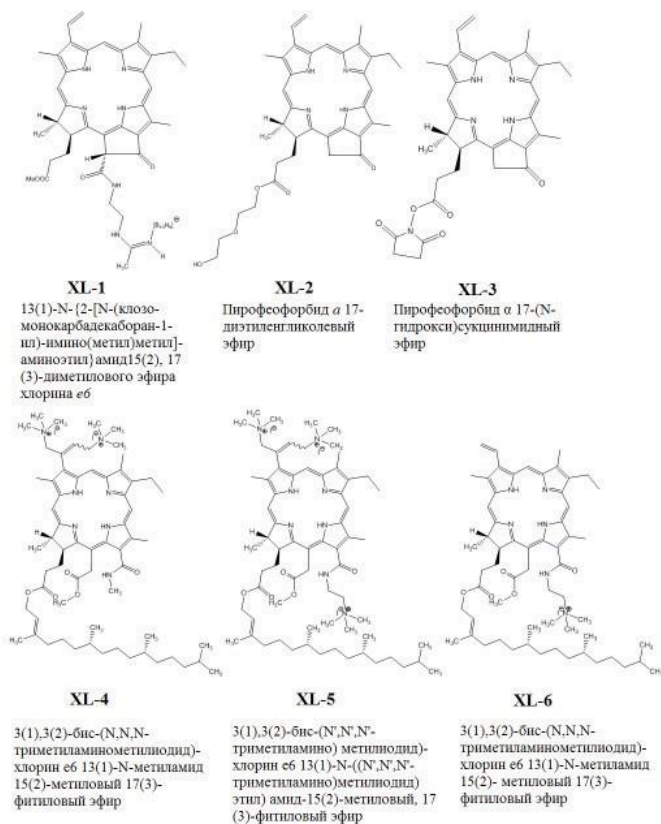


Рис. 1. Структурные формулы оригинальных производных XL

Частицы	Средний диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ	Индекс полидисперсности (PDI)	Общее содержание ФС, масс. %	Степень включения ФС, масс. %
NP-XL-1	252 ± 64	-15,0 ± 2,94	0,117	0,21	5,04
NP-XL-2	182 ± 79	-22,2 ± 3,75	0,129	4,63	87,7
NP-XL-3	245 ± 46	-17,2 ± 3,12	0,139	3,18	64,1
NP-XL-4	214 ± 52	-15,2 ± 4,33	0,131	3,81	82,9
NP-XL-5	224 ± 71	-17,4 ± 3,61	0,247	3,53	80,6
NP-XL-6	255 ± 68	-19,6 ± 2,86	0,213	2,45	72,3

Рис. 2. Физико-химические параметры полученных частиц

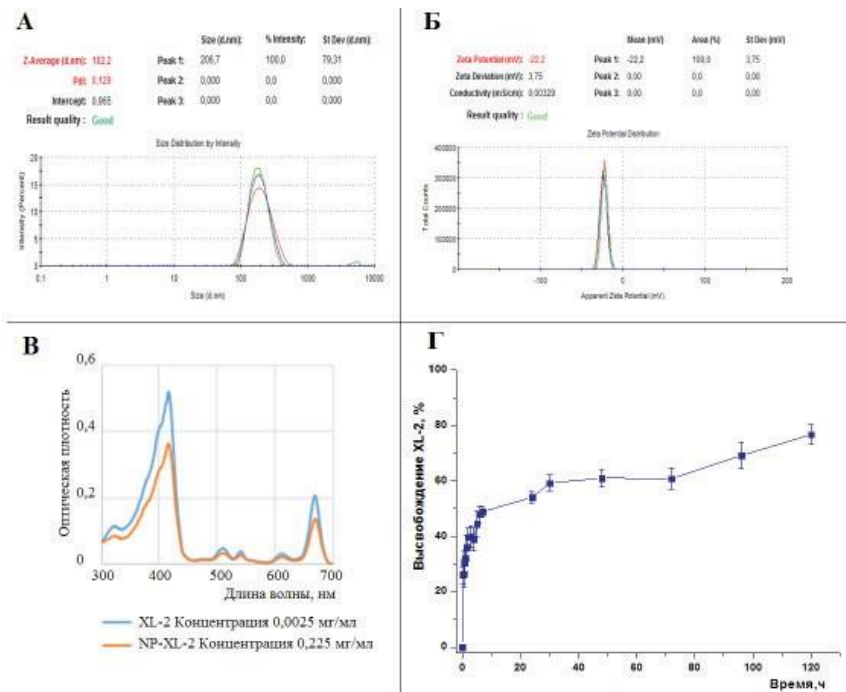


Рис. 3. Распределение размеров наночастиц NP-XL-2 по интенсивности светорассеяния (А); распределение дзета-потенциала NP-XL-2 (Б); спектр наночастиц NP-XL-2 в ДМСО в сравнении с субстанцией XL-2 (В); кинетика высвобождения XL-2 из NP-XL-2 при рН 7,4 (Г)

Таким образом, были получены наночастицы с новыми производными XL, были изучены их характеристики, наилучшая партия частиц NP-XL-2 обладала заявленными характеристиками. Следующий этап работы заключается в сравнении эффективности полученных частиц с субстанцией, поскольку применение наночастиц NP-XL-2 позволит увеличить биодоступность XL-2 и селективность действия *in vitro* и *in vivo*.

СМЕНЯЕМОСТЬ ТЕХНОЛОГИЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК*

NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGIES TURNOVER

Д. А. Белов¹, Д. В. Бочарова¹, Г. С. Лавров¹, Я. И. Алексеев^{1,2}, А. А. Евстрапов¹

¹ *Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

² *ООО «Синтол», Москва*

D. A. Belov¹, D. V. Bocharova¹, G. S. Lavrov¹, Ya. I. Alekseev^{1,2}, A. A. Evstrapov¹

¹ *Institute for Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg*

² *Syntol Ltd, Moscow*

E-mail: onoff_10@mail.ru

Аннотация

В работе выполнен анализ причин декоммерциализации трех технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК: пиросеквенирования компании 454 Life Sciences, секвенирования SOLiD компании Life Technologies и одномолекулярного секвенирования компании Helicos BioSciences. Выявлены недостатки, повлиявшие на уход этих технологий с рынка.

Abstract

The work describes decommercialization of three high-throughput sequencing technologies: pyrosequencing from 454 Life Science, SOLiD sequencing from Life Technologies, and single-molecule sequencing from Helicos BioSciences. Disadvantages that influenced these technologies withdrawal from the market are revealed.

Объем мирового рынка высокопроизводительного секвенирования ДНК в 2019 году, по оценкам Grand View Research, составил 9,78 млрд долл. США и, по прогнозам Data Bridge, будет расти в среднем на 19,6 % в год. Высокий рост рынка вызывает либо развитие, либо исчезновение существующих технологий.

Цель работы — анализ причин декоммерциализации технологий высокопроизводительного секвенирования.

© Д. А. Белов, Д. В. Бочарова, Г. С. Лавров, Я. И. Алексеев, А. А. Евстрапов, 2020

* Работа выполнена по Государственному заданию Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-01073-20-00 по теме № 0061-2019-0017.

В настоящее время с рынка исчезло три коммерческие технологии.

Технология пиросеквенирования компании 454 Life Sciences, основанная на детектировании неорганического пирофосфата (PPi), обеспечивала длинные прочтения, высокую скорость работы и была мало чувствительна к GC-составу, но в 2016 году производство и поддержка приборов были прекращены. Вытеснение технологии пиросеквенирования технологией полупроводникового секвенирования, предсказанное еще в 2013 году [1], вызвано следующими причинами:

- существенные эксплуатационные затраты из-за высокой стоимости реагентов;
- значительный диаметр используемых микросфер;
- высокие капитальные затраты из-за дорогостоящей оптической системы.

В 2005 году была разработана технология секвенирования SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection), основанная на циклическом лигировании коротких олигонуклеотидов, меченых флуорофорами. Преимущество технологии заключалось в высокой точности (до 99,99 %) и производительности (30 млрд п.н.).

Основные недостатки технологии: короткая длина прочтений (50–75 п.н.), длительность анализа (7–14 дней). После объявления компанией Life Technologies в 2013 году об окончании развития, на смену технологии SOLiD пришла технология секвенирования путем синтеза с детекцией сигнала флуоресценции от компаний Illumina.

Технология одномолекулярного секвенирования true Single Molecule Sequencing (tSMS)TM основана на детектировании флуоресцентно-меченых нуклеотидов. Небольшая длина чтения до 50 п. н., большое количество ошибок (3–5 %), а также вывод на рынок технологии одномолекулярного секвенирования компании Pacific Biosciences в 2010 году привели к оттоку покупателей. В конце 2012 года компания Helicos Biosciences была признана банкротом.

Все три приведенные технологии имели свои преимущества перед конкурентами, однако их недостатки наибольшим образом отразились на важнейших показателях конкурентного рынка — стоимости и времени проведения анализа.

Литература

1. Зубов В. В. Секвенирование по Ротбергу (потенциал полупроводникового секвенирования) // Биомика. 2013. Т. 5, № 12. С. 48–61.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ
С РЕГУЛИРУЕМЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ
СМЕШЕННОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА И ЕГО КОМПОЗИТОВ ***

**PREPARATION AND RESEARCH OF NEW MATERIALS
WITH CONTROLLED RELEASE OF BIOLOGICALLY ACTIVE
COMPOUNDS BASED ON MIXED IRON OXIDE AND ITS COMPOSITES**

Е. Н. Бобрикова ¹, Е. В. Дмитриенко ^{1,2}

*¹Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

²Новосибирский государственный университет

E. N. Bobrikova ¹, E. V. Dmitrienko ^{1,2}

¹ICBFM SB RAS, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

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

Аннотация

В настоящее время магнитным наночастицам уделяются особое внимание в области биомедицины, в частности, для целевых систем доставки биологически активных соединений (БАС). В данной работе получены и охарактеризованы 12 типов наноматериалов для доставки таких БАС, как противоопухолевые препараты, а также короткие синтетические олигонуклеотиды.

Abstract

At present, special attention is paid to magnetic nanoparticles in the biomedical field, in particular, for targeted delivery systems of biologically active compounds (BAS). In this work, 12 types of nanomaterials were obtained and characterized for the delivery of such BAS as antitumor drugs and short synthetic oligonucleotides.

Благодаря сочетанию магнитных свойств с нанометровой шкалой, магнитные НЧ являются привлекательным материалом для биомедицинских

© Е. Н. Бобрикова, Е. В. Дмитриенко, 2020

* Работа выполнена при поддержке АААА-А17-117020210021-7 и РФФ 18-14-00357.

и технологических применений. Возможность направленного изменения формы и размера, магнитных НЧ позволяет получать наноматериалы, сопоставимые с биологическими объектами, которые могут легко взаимодействовать и легко включаться в процессы, протекающие в живых системах. Действительно, диапазон размеров МНЧ очень разнообразен и может быть близок к размерам вирусов (20–450 нм), белков (5–50 нм) и клеток (10–100 мкм) в зависимости от методов синтеза и предполагаемой стимуляции клеточного поглощения. Таким образом, целью данной работы является получение и исследование наноматериалов на основе Fe_3O_4 и его композитов в качестве компонентов систем доставки биологически активных веществ.

В ходе работы были получены и исследованы 12 типов наноматериалов. Синтез магнитных наночастиц проводили с помощью метода соосаждения солей, варьируя условия и состав реакционной среды путем добавления детергентов (tween-20, tween-80) и поверхностно активных веществ (полиэтиленгликоль, олеиновая кислота). Был также предложен вариант функционализации поверхности МНЧ с целью получения композитных магнитных наноматериалов и нанокапсул на основе нейлона-6. Полученные МНЧ обладали различной морфологией с размерами от 16 до 250 нм. При исследовании цитотоксичности полученных наноматериалов показано, что все типы МНЧ, кроме III и IV, не образуют АФК и нетоксичны для клеток линии A549. Изучена эффективность взаимодействия полученных наноматериалов с биологически активными соединениями, такими как синтетические олигонуклеотиды и противоопухолевый антибиотик — доксорубин (DOX). Эффективность взаимодействия МНЧ-олигонуклеотид обладает незначительной зависимостью от нуклеотидной последовательности, максимальная емкость МНЧ характерна для олиготимидилатной последовательности и достигает $(4,8 \pm 0,2) \times 10^{-8}$ моль/мг. Максимальная емкость для противоопухолевого препарата наблюдается для нанокапсул 943 ± 15 мкг/мг DOX и композитных МНЧ 868 ± 37 мкг/мг DOX. В ходе экспериментов установлено, что эффективность высвобождения доксорубина является pH-зависимой. Показана противоопухолевая активность конструкции НЧ-DOX на живых системах. На лабораторных животных продемонстрировано отсутствие токсичности МНЧ и доказана эффективность конструкции МНЧ-DOX, превосходящая свободный препарат по противоопухолевой активности.

ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА НА ДНК-КОНСТРУКЦИИ ПРОТИВ АКТУАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE TO DNA VACCINES AGAINST ACTUAL VIRAL INFECTIONS.

М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко, А. П. Рудомётов, Д. В. Шаньшин,
С. В. Беленькая, А. А. Исаева, В. С. Несмеянова, Н. В. Волкова,
Д. Н. Щербаков, Е. В. Старостина, А. В. Зайковская,
Н. В. Данильченко, Л. А. Орлова, А. А. Ильичёв

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

M. B. Borgoyakova, L. I. Karpenko, A. P. Rudometov,
D. V. Shanshin, S. V. Belenkaya, A. A. Isaeva, V. S. Nesmeyanova,
N. V. Volkova, D. N. Shcherbakov, E. V. Starostina, A. V. Zaikovskaya,
N. V. Danilchenko, L. A. Orlova, A. A. Ilyichev

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru

Аннотация

Были созданы ДНК-конструкции, содержащие гены белка S и его домена RBD вируса SARS-CoV-2. Иммунизация мышей ДНК-вакцинами вызвала формирование антител, специфично распознающих вирусные белки S и RBD и обладающих высокой нейтрализующей активностью. Также было показано, что у мышей в результате иммунизации формируется специфический Т-клеточный ответ.

Abstract

DNA-based vaccines were engineered containing genes of SARS-CoV-2 S protein and its receptor-binding domain (RBD). Following immunization of mice antigen-specific antibodies with high neutralization activity and T-cell response were measured.

События 2020 года в области мирового здравоохранения показали, насколько важно иметь платформы, на основе которых можно быстро создать

© М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко, А. П. Рудомётов, Д. В. Шаньшин, С. В. Беленькая, А. А. Исаева, В. С. Несмеянова, Н. В. Волкова, Д. Н. Щербаков, Е. В. Старостина, А. В. Зайковская, Н. В. Данильченко, Л. А. Орлова, А. А. Ильичёв, 2020

безопасную вакцину на вновь возникший вирус. Такими платформами, безусловно, являются стратегии создания иммуногенных конструкций на основе нуклеиновых кислот. Так, можно получить готовые прототипы вакцин уже через несколько недель после прочтения вирусного генома. ДНК-конструкты создаются *de novo*, не имея в своей основе инфекционных агентов, что повышает их безопасность и возможность использования для групп риска: пожилых, детей и людей с ослабленным иммунитетом.

Целью данного исследования являлась оценка иммунного ответа на введение ДНК-вакцин, содержащих полный ген белка S и его рецептор-связывающего домена RBD вируса SARS-CoV-2, мышам BALB/c.

Белок S является поверхностным гликопротеином, отвечающим за связывание и проникновение вируса в клетки-мишени. RBD — рецептор-связывающий домен, содержащий большое количество эпитопов нейтрализующих антител. Были получены две ДНК-вакцины: pVAX-S-PG и pVAX-RBD-PG, кодирующие белки S и RBD. С целью повышения иммуногенности конструкций их вводили животным в оболочке конъюгата полиглобулина со спермидином. Также была сформирована группа животных, которой одновременно вводили pVAX-RBD-PG и белок RBD. Контрольной группе вводили физраствор.



Рис. 1. Схема иммунизации и забора крови у мышей: введение вакцин на 0, 13 и 29 дни, забор крови на 19 и 43 дни

Динамику гуморального иммунного ответа исследовали с помощью ИФА. Анализ показал существенное усиление иммунного ответа в группах, иммунизированных pVAX-RBD-PG (в сочетании с белком и без), через две недели после третьей иммунизации по сравнению с более ранними показателями.

У групп, иммунизированных вакциной pVAX-RBD-PG, были обнаружены высокие титры специфических антител, что было показано

в ИФА. При этом наиболее высокие титры показаны в группе, иммунизированной комбинированной вакциной pVAX-RBD-PG+белок RBD (1:113400 и 1:170100 на RBD и S-белке, соответственно) (рис. 2). Сыворотки из этой группы также с гораздо более высокой эффективностью нейтрализовали вирус SARS CoV-2 штамм nCoV/Victoria/1/2020 в реакции вирус-нейтрализации.

Специфический Т-клеточный ответ оценивали с помощью метода ELISpot. Было показано, что спленоциты мышей из групп, вакцинированных pVAX-RBD-PG+белок RBD и pVAX-S-PG, гораздо сильнее ответили на белковую стимуляцию выбросом IFN γ , чем контрольная группа.

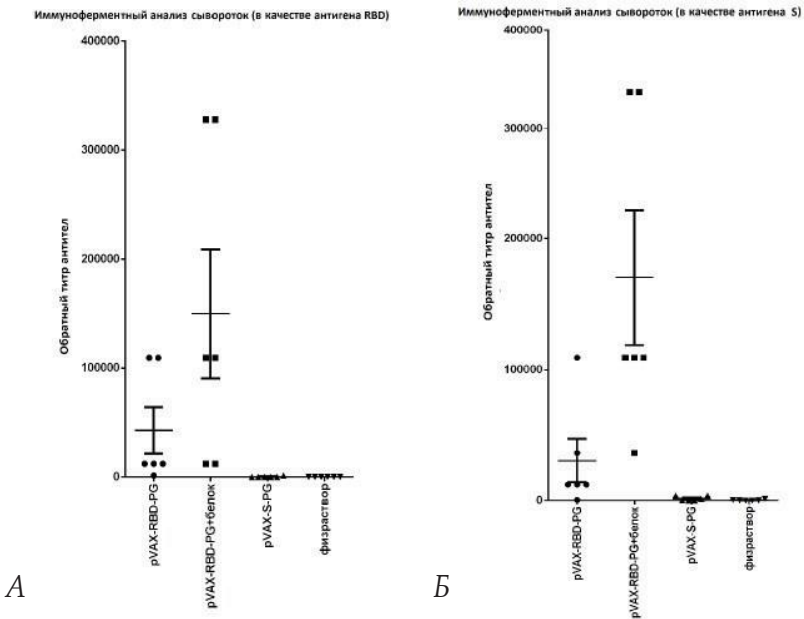


Рис. 2. Специфичность иммунного ответа на 43 день, показанная в ИФА:
А — RBD в качестве антигена; Б — белок S

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что созданные конструкции могут быть основой для будущей вакцины против COVID-19.

ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТЯЖЕННЫХ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО КНИ-БИОСЕНСОРА *

DETECTION OF EXTENDED RNAs USING AN ELECTROCHEMICAL SOI FET BIOSENSOR

А. Е. Булгакова, Е. В. Дмитриенко

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

A. E. Bulgakova, E. V. Dmitrienko

*ICBFM SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

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

Аннотация

Разработан электрохимический КНИ-биосенсор для выявления мРНК белка тропонина и патогенных бактериальных рРНК. Исследованы незаряженные аналоги НК в качестве специфических зондов, продемонстрировано специфичное выявление НК-маркеров с чувствительностью 10^{-19} М.

Abstract

An electrochemical SOI FET biosensor has been developed to detect mRNA of cardiac troponin and pathogenic bacterial rRNAs. Uncharged nucleic acid analogs were studied as specific probes. Specific identification of nucleic acid markers with high sensitivity (10^{-19} M) was demonstrated.

Разработка сверхчувствительных биосенсорных систем — актуальное направление биотехнологии в настоящее время из-за возможности быстрого, специфичного и количественного определения биоаналитов. Благодаря выверенному процессу изготовления, высокому соотношению сигнал/шум и реакции в реальном времени, электрохимические биосенсоры являются золотым стандартом для повседневного применения. Области применения

© А. Е. Булгакова, Е. В. Дмитриенко, 2020

* Работа выполнена при поддержке АААА-А17-117020210021-7 и РФФ 18-14-00357.

биосенсоров очень широки: анализ контаминации пищевых продуктов, контроль окружающей среды, устройства мониторинга состояния больного, диагностикумы для обнаружения биологически значимых молекул. Выявление с помощью биосенсорных устройств таких биомаркеров, как ДНК и РНК, позволяет получить ценную информацию для ранней диагностики, мониторинга различных типов опухолей и генетических заболеваний, особенно когда это невозможно осуществить на месте, используя традиционные методы, в силу длительного выделения и дорогостоящего лабораторного оборудования, которое трудно транспортировать и использовать в местах оказания медицинской помощи.

В качестве высокочувствительного электрохимического биосенсорного устройства может выступать микро- и/или нанопроволочный транзистор со структурой «кремний на изоляторе» — КНИ-биосенсор. Принцип детекции биомолекул с использованием данного типа биосенсора основан на том, что заряды биомолекул, адсорбированных на поверхности нанопроволоки, индуцируют образование компенсирующих зарядов в наноразмерной структуре. В результате возникает ток, который течет между двумя электродами, фланкирующими нанопроволоку. Таким образом, связывание биомолекул в исследуемом образце на поверхности сенсорного элемента приводит к изменению его поверхностного потенциала и, как следствие, к изменению силы тока, проходящего через сенсорный элемент. Преимущество таких биосенсоров заключается в label-free детекции, высокой чувствительности и малом количестве образца при анализе.

В рамках данной работы на синтетических модельных системах исследована возможность выявления мРНК белка тропонина, ассоциированного с гибелью сердечной мышцы при инфаркте миокарда, и патогенных бактериальных рРНК с применением КНИ-биосенсора. В ходе работы был проведен сравнительный анализ эффективности и селективности гетерофазной гибридизации нативных олигонуклеотидов и незаряженных производных НК –фосфорилгуанидиновых аналогов олигонуклеотидов (ФГО) в качестве специфических зондов, иммобилизованных на поверхность сенсора. Незаряженные аналоги НК, в том числе ФГО, перспективны как зонды при разработке биосенсорных устройств, в которых формирование специфического сигнала ассоциировано с изменением локального заряда вблизи сенсорной поверхности, к которому относится КНИ-биосенсоры. В рамках предложенных модельных систем продемонстрирована возможность образования специфического гибридного комплекса мишень/комплементарный зонд. Показана высокая чувствительность анализа на аттомолярном уровне, что демонстрирует перспективы КНИ-биосенсора в экспресс-диагностике.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ CHLORELLA SOROKINIANA AM-02 *

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW STRAIN OF MICROALGAE CHLORELLA SOROKINIANA AM-02

С. С. Булынина, Э. Э. Зиганшина, Р. Ф. Ахметова, А. М. Зиганшин

Казанский (Приволжский) федеральный университет

S. S. Bulynina, E. E. Ziganshina, R. F. Akhmetova, A. M. Ziganshin

Kazan (Volga region) Federal University

E-mail: SvSBulynina@stud.kpfu.ru

Аннотация

В настоящее время в мире резко возрос интерес к биотехнологиям на основе разнообразных микроводорослей как с целью получения ценных биопродуктов из них, так и с целью создания производств, ориентированных на переработку разнообразной биомассы (в том числе и отходов производства). Так, впервые на основе результатов оптимальных параметров роста нового штамма *Chlorella sorokiniana* AM-02 было исследовано влияние дополнительных источников азота и серы на продуктивность микроводорослей. Полученные результаты позволяют рассмотреть данный штамм зеленых микроводорослей в качестве перспективного агента биоремедиации водных экосистем, загрязненных высокими уровнями нитратов, фосфатов и сульфатов.

Abstract

At present, the world has increased interest in biotechnologies based on a variety of microalgae, both with the aim of obtaining valuable bioproducts from them, as well as with the aim of creating industries focused on processing a variety of substrates (including wastes). Thus, based on the results of the optimal growth parameters of the strain *Chlorella sorokiniana* AM-02, the effect of additional sources of nitrogen and sulfur on the productivity of microalgae was studied for the first time. The results allow us to consider this strain of green microalgae as a promising agent for the bioremediation of aquatic ecosystems contaminated with high levels of nitrates, phosphates, and sulfates.

© С. С. Булынина, Э. Э. Зиганшина, Р. Ф. Ахметова, А. М. Зиганшин, 2020

* Работа выполнена при финансовой поддержке «Российского фонда фундаментальных исследований» в рамках научного проекта № 18-34-20002.

Представители разнообразной группы фотосинтезирующих микроорганизмов обладают высоким потенциалом для крупномасштабного культивирования с целью производства широкого спектра ценной продукции (в том числе пигментов, антиоксидантов, белков, липидов), однако информации для проведения успешных коммерческих испытаний все еще недостаточно. Эффективность таких биотехнологий в первую очередь зависит от особенностей метаболизма вида, а также от параметров, влияющих на его рост и продуктивность.

Объектом исследования была культура зеленых микроводорослей *Chlorella sorokiniana* AM-02, выделенная в 2018 году из водоема города Казани (Россия). С целью подбора оптимального состава питательной среды для эффективного культивирования штамма AM-02 инокулят микроводорослей культивировали в фотобиореакторе объемом 3,6 л (Labfors 4 Lux, Infors HT) с контролем основных параметров. Образцы для контроля роста и продуктивности микроводорослей (в том числе параметры роста, содержание пигментов в клетках, а также потребление основных компонентов культуральной среды) отбирали после каждого светового и темного периода.

Эксперименты по подбору оптимального состава среды позволили заключить, что увеличение концентрации нитрата натрия от 180 до 720 мг/л положительно отразилось на количестве клеток и сухом весе микроводорослей. В заданных условиях штамм AM-02 активно утилизировал нитрат- и сульфат-ионы (100%-я эффективность удаления), а также значительно снижал концентрацию фосфат-ионов в среде культивирования. Отдельно стоит отметить, что добавление дополнительного источника азота в среду культивирования стимулировало синтез пигментов. Таким образом, показатели роста и продуктивности штамма *C. sorokiniana* AM-02 выносят его в ранг перспективных для производства биомассы, пигментов и биоремедиации водных сред, загрязненных высокими уровнями азота, фосфора и серы.

**ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ
ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ *BOS BOVIS***

**EXPRESSION SYSTEMS FOR *BOS BOVIS* TERMINAL
DEOXYNUCLEOTIDYLTRANSFERASE BIOSYNTHESIS**

Ю. П. Буренкова, В. В. Щур, С. А. Усанов, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Y. P. Burenkova, V. V. Shchur, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich

*Institute of Biophysics and Cell Engineering,
National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, Minsk*

E-mail: ms.yuliyab@mail.ru

Аннотация

Синтезирована нуклеотидная последовательность гена терминальной дезокси-
синуклеотидилтрансферазы (ТдТ) *Bos bovis*, предназначенная для направленной
эволюции фермента с целью получения термостабильных форм с измененной суб-
стратной специфичностью. Созданы плазмидные вектора для гетерологической экс-
прессии ТдТ (pCW-TdT и pET20b-TdT) в клетках *E. coli* штаммов DH5 α и BL21(DE3).

Abstract

The *Bos bovis* terminal deoxynucleotidyltransferase (TDT) gene was synthesized, in-
tended for directed enzyme evolution in order to obtain thermostable forms with altered
substrate specificity. Plasmid vectors for heterologous expression of TDT (pCW-TdT,
pET20b-TdT) in *E. coli* cells of DH5 α and BL21 (DE3) strains have been created.

Введение

ТдТ, открытая около 60 лет назад, остается одним из мало изученных
ферментов, катализирующих синтез ДНК. Фермент способен включать
случайные дНТФ в цепь ДНК и создавать геномный материал *de novo* [1].
ТдТ быка — один из самых активных ферментов. Однако наиболее изуче-
ны ТдТ человека и мыши [1]. Так, в PDB 39 записей для структуры ТдТ

мыши и ни одной для ТдТ быка (идентичность 81 %). Это же касается систем гетерологической экспрессии [1, 2].

Целью работы было создание систем экспрессии ТдТ в клетках *E. coli*. Осуществлен синтез гена, пригодного для получения транскрибированных ТдТ и мутагенеза. Получение стабильных форм ТдТ с измененной субстратной специфичностью открывает возможности разработки метода направленного энзиматического *de novo* синтеза одноцепочечной ДНК в водных средах [3].

Материалы и методы

Последовательность гена ТдТ быка (NP_803461, 1560 п.о.) оптимизирована для экспрессии в *E. coli*. Фосфорамидитным методом синтезировано 42 олигонуклеотида с T_m перекрытий 72 °С (ДНК-синтезатор H32, K&A, 100 наномолярный масштаб, CPG 1000 Å). Депротекция и отщепление — 34 % NH_3 водный (16 ч, 55 °С), ТФЭ-очистка — Supelclean ENVIC18 (Supelco).

Проведена ПЦР-сборка гена (термоциклер Терцик, ДНК-технологии) с клонированием в вектор pJET1.2/blunt (ThermoScientific). Добавлены сайты рестрикции к 5'(Nde I) и 3'(HindIII) концам, 6His-метка на N-конце. Синтетический ген клонирован из промежуточного вектора в вектора экспрессии pET20b и pCWori по сайтам Nde I и HindIII. Секвенировали на 3500xL Genetic Analyzer, AB.

Штаммы BL21(DE3) и DH5α *E. coli* трансформировали полученными плазмидами. Индивидуальные колонии с рекомбинантной плазмидой культивировали в среде LB (100 мкг/мл Amp) при 37 °С и 220 об/мин до оптической плотности $D_{600} = 0,6$. Индуцировали синтез добавлением IPTG (1 мМ). Экспрессию белка проводили 13 часов при 20 °С и 180 об/мин. Фермент был очищен металл-хелатной хроматографией.

Выводы

В ходе работы получен ген ТдТ, оптимизированный для направленной инженерии фермента. Созданы вектора для гетерологической экспрессии ТдТ в клетках *E. coli* штаммов DH5α и BL21(DE3): pCW-TdТ (tac-промотор) и для BL21(DE3) *E. coli* — pET20b-TdТ (T7-промотор). Направленная инженерия ТдТ позволит лучше понять механизмы биосинтеза ДНК и сделать шаг к разработке методов ферментативного *de novo* синтеза ДНК в водных средах.

Литература

1. Curr. Opin. Struct. Biol. 53, 22–31. 2018.
2. Biochem. Insights 3, 41–46. 2010.
3. Nat. Biotechnol. 36, 645–650. 2018.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И КОНТРАСТНЫЕ СВОЙСТВА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

SPECIFIC ACTIVITY AND CONTRAST PROPERTIES OF MAGNETIC NANOPARTICLES MODIFIED WITH SERUM ALBUMIN

А. В. Бычкова¹, М. Н. Якунина², М. В. Лопухова¹,
В. С. Покровский^{2,3}, Д. С. Хачатрян⁴

¹ *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*
² *ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва*
³ *Российский университет дружбы народов, Москва*
⁴ *НИЦ «Курчатовский институт», Москва*

A. V. Bychkova¹, M. N. Yakunina²,
M. V. Lopukhova¹, V. S. Pokrovsky^{2,3}, D. S. Khachatryan⁴

¹ *IBCF RAS, Moscow*

² *N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow*

³ *RUDN University, Moscow*

⁴ *National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow*

E-mail: anna.v.bychkova@gmail.com

Аннотация

На поверхности магнитных наночастиц закреплено покрытие из сывороточного альбумина. Полученные частицы со средним диаметром 35 нм стабильны в золе. Показано двукратное ингибирование роста опухоли при в/а введении крысам с РС-1, без побочных реакций, и стойкое выраженное контрастирование сосудов опухоли при КТ-исследовании.

Abstract

The coating of human serum albumin has been crosslinked on the surface of magnetic nanoparticles. The synthesized particles (~35 nm) stable in sol have been intraarterially administered in tumor (hepatocellular carcinoma) implanted to rats. Long-term (within 14 days of the experiment) presence of the particles in the tumor vascular bed and inhibition of the tumor growth have been detected without side effects.

Разработка наносистем на основе магнитных наночастиц для терапии и диагностики опухолей является одним из наиболее активно развиваемых направлений современной нанобиотехнологии. Целью нашей работы было получение наносистем с диаметрами от 20 до 50 нм на основе магнитных наночастиц (МНЧ) магнетита с устойчивым ковалентно сшитым покрытием из человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), проведение оценки переносимости, специфической активности и контрастирующих свойств наносистем при в/а введении.

Устойчивые покрытия из ЧСА на МНЧ получали путем свободнорадикального сшивания адсорбированных молекул ЧСА на поверхности МНЧ по реакции Фентона.

Клинические исследования выполнены на 8-недельных половозрелых крысах-самцах ($n = 21$) массой тела 80–100 г. Трансплантацию РС-1 выполняли в заднюю группу мышц бедра (бассейн кровоснабжения бедренной артерии, *a. femoralis*) по 0,25 мл 20%-й взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса. Экспериментальной группе ($n = 9$) с развившимся опухолевым узлом в/а однократно вводили 0,3 мл (60 мкг МНЧ). Контрольной группе ($n = 12$) в/а вводили физиологический раствор.

Оценку контрастирования опухоли проводили двукратно через 30 минут и 13 дней. КТ-исследование опухолевого узла показало выраженное контрастирование сосудистого русла опухоли с плотностью сосудов от –47 до –80 НУ при плотности ткани опухоли от –24 до –26 НУ.

Ингибирование роста опухоли определяли на основании индекса прироста в группах (ИПО = V_t/V_0) на 4, 7, 10, 13, 16 и 20-е сутки после начала лечения (V_t), для чего определяли V_{cp} опухолей перед началом и на сутки наблюдения. В группе контроля ($V_0 = 6513,4 \pm 52,2 \text{ мм}^3$) на 21-е сутки роста после трансплантации на 41-е сутки (окончание наблюдения) V_{cp} 13-кратно увеличился до $V_{t20} = 76121,3 \pm 3275,4 \text{ мм}^3$. ИПО в этот период составил $V_{t4}/V_0 = 1,39 \pm 0,34$, $V_{t7}/V_0 = 2,5 \pm 0,9$, $V_{t10}/V_0 = 4,9 \pm 2,0$, $V_{t13}/V_0 = 7,5 \pm 3,2$, $V_{t16}/V_0 = 9,9 \pm 4,2$, $V_{t20}/V_0 = 12,9 \pm 5,6$. В группах эксперимента отмечено двукратное торможение роста опухоли. Опухоли с $V_0 = 6315,9 \pm 2418,56 \text{ мм}^3$ в начале лечения на 41-й день наблюдения выросли до $V_{t20} = 39416,4 \pm 35808,5 \text{ мм}^3$. ИПО в этот период составил $V_{t4}/V_0 = 1,3 \pm 0,2$, $V_{t7}/V_0 = 1,3 \pm 0,15$, $V_{t10}/V_0 = 1,7 \pm 1,3$, $V_{t13}/V_0 = 3,1 \pm 2,9$, $V_{t16}/V_0 = 4,5 \pm 4,3$, $V_{t20}/V_0 = 6,4 \pm 5,4$. Локальных и системных токсических эффектов не отмечали.

РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ УПАКОВКИ «EAT PASC»*

DEVELOPMENT OF A RECIPE AND TECHNOLOGY OF BIODEGRADABLE PACKAGING “EAT PACK”

А. В. Васильева

*Алтайский государственный технический университет
им. И. И. Ползунова, Барнаул*

A. V. Vasileva

AltSTU, Barnaul

E-mail: vasilevaann97@yandex.ru

Аннотация

На сегодняшний день наиболее остро стоит проблема потребления и переработки упаковочных полимерных материалов, разрабатываются биопластики, полностью распадающиеся на H_2O и CO_2 , не наносящие вред окружающей среде, полученные из натурального возобновляемого сырья. В пищевой промышленности наметился тренд на создание «съедобных» упаковок.

Abstract

Today, the most acute problem is the consumption and processing of packaging. At the moment, bioplastics (completely decomposing into H_2O and CO_2 that are not harmful to the environment), obtained from natural renewable raw materials, are being developed, and a trend towards the creation of “edible” packaging is outlined in the packaging materials of the food industry.

Согласно «Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года», производство биodeградируемых полимеров является важным направлением программы в условиях ужесточающихся требований к защите окружающей среды и роста стоимости ути-

© А. В. Васильева, 2020

* Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (мнемокод 0611-2020-013; номер темы FZMM-2020-0013, ГЗ № 075-00316-20-01).

лизации отходов. В этой связи целью нашего исследования было создание биodeградируемой «съедобной» упаковки.

На начальном этапе реализовано решение создания упаковочных материалов из картофельного крахмала. Использовалось свойство молекулы крахмала — амилопектина — рваться и переплетаться под воздействием температуры и агрессивных сред, создавая аналог пластика.

Технология состоит из следующих этапов: сначала из сырья получают клейстер, где для интенсификации процесса гидролиза крахмала используется уксусная кислота. В качестве пластификатора добавляется глицерин. Затем полученную вязкую массу формируют процессом литья (полученная масса выливается на форму) и сушат до необходимой влажности.

Массу сушили двумя способами: при температуре окружающей среды (23 ± 2) °C и в конвекционной печи (60–70 °C) на формах. Первый способ сушки был признан нецелесообразным из-за большой длительности (4–6 дней) и повышенного риска микробиологической обсемененности. После сушки конвекционным способом высушенная пленка-пласт была тонкой, прозрачной, легко ломалась и крошилась.

Для нивелирования этого недостатка было принято решение увеличить толщину и влажность готовой пленки путем замены части крахмала пюрированной фруктовой составляющей из банана. Несомненным преимуществом банана как сырья для переработки является высокое содержание устойчивых к высокой температуре микронутриентов, низкая себестоимость и повсеместная доступность. Кроме того, в связи с быстрой потерей товарных достоинств бананов в процессе хранения, возникает проблема утилизации или переработки дефектных плодов, которая частично решается в рассматриваемом исследовании.

Для сушки бананово-крахмальной массы использовался способ конвекционной сушки в печи при температуре до 70 °C в течение 6–7 часов. При таком способе на поверхности образовывалась легкая сухая корка, препятствуя дальнейшему выходу влаги, в результате материал приклеивался к форме, из-за чего рвался при последующем снятии.

Для устранения проблемы использовался диэлектрический (микроволновый) нагрев. Поскольку выдавленную влагу не требуется испарять, обеспечение за счет выдавливания происходит практически без затрат энергии, что значительно повышает эффективность сушки. После интенсивного нагрева в процессе сушки масса на формах остывает и затем легко снимается.

Таким образом, удалось получить продукт с низкой влажностью, обеспечивающей длительное хранение, с хорошей пластичностью, не размокающий при упаковывании в нее продукции в течение 10–12 ч.

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ГЕЛЯ С АРТИЛИЗИНОМ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ

DEVELOPMENT OF THE COMPOSITION AND TECHNOLOGY OF ARTILISIN GEL FOR WOUND INFECTION THERAPY

А. М. Воробьёв¹, М. Н. Анурова¹, А. В. Алёшкин¹, В. А. Гушчин²,
Д. В. Васина², Н. П. Антонова², Е. Р. Мехтиев¹

¹Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора

²ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

A. M. Vorobev¹, M. N. Anurova¹, A. V. Aleshkin¹, V. A. Gushchin²,
D. V. Vasina², N. P. Antonova², E. R. Mekhtiev¹

¹G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute
for Epidemiology and Microbiology, Moscow

²FSBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology
named after the honorary academician N. F. Gamaleya», Moscow

E-mail: vorobjew.alex2010@yandex.ru

Аннотация

Разработан гель на основе гидроксипропилцеллюлозы для терапии раневых инфекций, содержащий в качестве действующего вещества рекомбинантный модифицированный эндолизин (артилизин) LysECD7-SMAP. Доказана эффективность препарата в опыте на животных.

Abstract

A gel based on hydroxyethylcellulose for the treatment of wound infections has been developed, containing the recombinant modified endolysin (artilisin) LysECD7-SMAP as an active ingredient. The effectiveness of the drug has been proven in animal experiments.

Эндолизин — ферменты бактериофагов, которые синтезируются в конце литического цикла вируса и разрушают клеточную стенку бактерии, способствуя высвобождению зрелых вирусных частиц. По сравнению

с бактериофагами, эндолизины обладают более широким спектром действия и более простой технологией получения, что делает их перспективными кандидатами для разработки бактерицидных препаратов на их основе.

Объектом исследования является рекомбинантный модифицированный эндолизин (артилизин) LysECD7-SMAP, полученный биотехнологическим методом с использованием штамма-продуцента, несущего плазмиду, кодирующую белок.

В рамках данной работы был определен спектр его бактерицидной активности, разработан препарат в форме геля для применения на раневой поверхности и доказаны его эффективность и безопасность.

Показан более широкий спектр бактерицидной активности артилизина по сравнению с бактериофагом ECD7. В то время как бактериофаг проявляет активность в отношении *Escherichia coli*, *Shigella sonne* и *Shigella flexner*, артилизин был активен в отношении *Listeria monocytogenes* (89,6 % убитых клеток), *Staphylococcus aureus* (47,25 % убитых клеток), *Acinetobacter baumannii* (99,8 % убитых клеток), *E. coli* (91 % убитых клеток), *Enterobacter spp.* (57,8 % убитых клеток) и *Pseudomonas aeruginosa* (75,4 % убитых клеток).

На основе артилизина разработан гель, содержащий в качестве вспомогательных веществ гидроксипропилцеллюлозу и полиэтиленгликоль. Выбранные полимеры обладают формообразующими, биоадгезивными и пенетрационными свойствами. Подобраны оптимальные концентрации вспомогательных веществ, определены технологические показатели и сроки хранения. Доказано, что препарат сохраняет свои свойства в течение трех месяцев при температуре хранения 4 ± 2 °C и влажности 60 ± 5 %. Исследование стабильности в процессе хранения продолжается.

Проведена валидация методик определения показателей качества (подлинность и специфическая активность).

Доказана эффективность препарата при испытании на животных, а также отсутствие токсического действия и иммунного ответа при применении на раневой поверхности.

Полученные данные позволяют судить о перспективности данного направления борьбы с бактериальными инфекциями на фоне возрастающей антибиотикорезистентности и открывают новые возможности в создании эффективных и безопасных бактерицидных препаратов.

**ФОТОЗАВИСИМОЕ РАЗРУШЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА А
В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ АСТАКСАНТИНА,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КЛЕТОК НАЕМАТОСОЦКУС ПЛУВИАЛИС***

**PHOTO-DEPENDENT DEGRADATION OF CHLOROPHYLL A
IN THE PRESENCE OF VARIOUS FORMS OF ASTAXANTHIN ISOLATED
FROM НАЕМАТОСОЦКУС ПЛУВИАЛИС CELLS**

Е. В. Вязов¹, Р. Г. Гончарик¹, Е. А. Куликов²,
С. В. Алешин², А. А. Селищева³

¹ *Институт биофизики и клеточной
инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

² *Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт», Москва*

³ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Y. V. Viazau¹, R. G. Goncharik¹, E. A. Kulikov²,
S. V. Aleshin², A. A. Selishcheva^{2,3}

¹ *Institute of Biophysics and Cell Engineering,
National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, Minsk*

² *NRC Kurchatov Institute, Moscow*

³ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

E-mail: yauhen.viazau@gmail.com

Аннотация

Изучено влияние астаксантина на разрушение хлорофилла *a* под действием красного света. Показано защитное действие астаксантина как в форме эфиров, так и в свободной форме с разной долей цис-изоформ. Предположительно, оно обусловлено эффективным тушением генерирующегося на свету синглетного кислорода. Установлено, что при низкой концентрации астаксантина его защитное действие выражено в более полярной среде.

© Е. В. Вязов, Р. Г. Гончарик, Е. А. Куликов, С. В. Алешин, А. А. Селищева, 2020

* Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19РМ-010) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-54-04003).

Abstract

The effect of astaxanthin on the degradation of chlorophyll *a* under action of red light has been studied. The protective effect of astaxanthin in such system has been shown for both its ester form and free form with different shares of *cis*-isomers. Presumably, it is due to the efficient quenching of singlet oxygen generated in the light. It was found that at a low concentration of astaxanthin, its protective effect is more pronounced in a more polar environment.

Кетокаротиноид астаксантин является эффективным природным антиоксидантом. На данный момент слабо изучены различия в антиоксидантной активности *cis*- и *trans*-изоформ астаксантина и его эфиров, и практически не изучено их влияние на окисление хлорофилла светом или различными окислителями. Мы предполагаем, что функции астаксантина (и его эфиров) определяются как структурой самой молекулы, так и окружающей ее средой, в первую очередь ее диэлектрической проницаемостью.

В данной работе изучено влияние астаксантина на фотоиндуцированное окисление хлорофилла *a* (Хл *a*) в 100%-м ацетоне (полярная среда) и смеси гептан:бутанол 82:18 (слабополярная среда). Хл *a* экстрагировали ацетоном из клеток *Spirulina platensis*. Эфиры астаксантина экстрагировали 100%-м гексаном из клеток *Haematococcus pluvialis*, а затем разделяли с помощью колоночной хроматографии и перерастворяли в 100%-м ацетоне либо в смеси гептан:бутанол 82:18. Для приготовления раствора свободного астаксантина использовали коммерческий трансастаксантин (Sigma-Aldrich). Часть раствора свободного транс-астаксантина освещали белым светом 4 ч (3000 лк), что приводило к частичной изомеризации (появлялось $\approx 7\%$ *cis*-изомеров астаксантина). К 500 мкл экстракта Хл *a* (концентрация — 29 мкМ) добавляли по 500 мкл растворов астаксантина (в положительном и отрицательном контролях добавляли 500 мкл соответствующего растворителя) и освещали 2 ч 20 мин красным светом (610–700 нм, 2300 лк) при 24 °С. Конечная концентрация всех форм астаксантина — 4 мкг/мл смеси (в пересчете на свободный трансастаксантин), что составляет 6,7 мкМ. Положительный контроль не освещали.

Используемый в опытах красный свет практически не поглощается молекулами астаксантина, однако эффективно поглощается Хл *a*, что позволяет исключить эффект экранирования. В опытах наблюдалось подавление фотозависимого разрушения Хл *a* при внесении в смесь астаксантина. При использованной относительно небольшой концентрации астаксантина разрушение Хл *a* было снижено на 22–43 % по сравнению с отрицательным

контролем (без астаксантина), где разрушалось около 40 % молекул Хл *a*. В отдельных опытах нами было показано подавление разрушения Хл *a* в таких условиях при добавлении тушителя синглетного кислорода. Таким образом, можно говорить о том, что астаксантин защищает Хл *a* от окислительной деструкции, вызванной действием синглетного кислорода, генерируемого на свету, вероятно, участвуя в тушении последнего. В данных опытах в среднем не было выявлено существенных различий по величине действия между формами астаксантина. В то же время защитный эффект астаксантина был значительно менее выражен в слабополярной среде (гептан:бутанол), чем в полярной (ацетон).

Литература

1. Naguib Y.M. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids // *J. Agric. Food Chem.* 2000. Vol. 48(4). P. 1150–1154. doi: 10.1021/jf991106k
2. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition // *J. Nat. Prod.* 2006. Vol. 69(3). P. 443–449. doi: 10.1021/np050354+

АНАЛИТ-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АНТИСМЫСЛОВОЙ ДНК

ANALYTE-DEPENDENT ACTIVATION OF THERAPEUTIC ANTI-SENSE DNA

Е. Д. Григорьева, Д. Д. Недорезова

*Университет ИТМО, Международный научный центр SCAMT,
Санкт-Петербург*

E. D. Grigorieva, D. D. Nedorezova

ITMO University, SCAMT laboratory, St. Petersburg

E-mail: grigorieva@scamt-itmo.ru

Аннотация

Перспективной разработкой в генной терапии рака является использование антисмысловых олигонуклеотидов (антисенс) — коротких ДНК-фрагментов, способных подавлять экспрессию генов за счет запуска антисмысловых механизмов в клетке [1]. Связываясь с целевой РНК, антисенс-цепь формирует стабильный РНК-ДНК дуплекс, который деградирует под действием эндорибонуклеазы RNase HI, специфично гидролизующей связь O5'-P РНК, находящейся в комплексе с ДНК [2]. Для улучшения стабильности, эффективности и селективности подхода было предложено создать ДНК-конструкцию на основе бинарных антисенс для более эффективного и высокоселективного расщепления целевых мРНК.

Abstract

Promising development for the cancer gene therapy is the application of therapeutic antisense oligonucleotides (antisense) — short DNA fragments responsible for suppressing gene expression by triggering antisense mechanisms in the cell [1]. By binding to the target RNA, the antisense strand forms a stable RNA-DNA duplex, which is degraded by the endoribonuclease RNase HI, which specifically hydrolyzes the O5'-P RNA bond in a complex with DNA [2]. To improve the stability, efficiency and selectivity of the approach, it was proposed to create a DNA construct based on binary antisense for more efficient and highly selective cleavage of mRNA target.

Бинарный подход используют две синтетические цепи ДНК Asoa и Asob, которые представляют собой исходную последовательность антисенс, разделенную на две части, каждая из которых оборудована аналит-распознающими руками [3]. В качестве целевой РНК предполагается использовать мРНК гена домашнего хозяйства, а в качестве аналита — ген, высокоспецифичный для раковых клеток. Таким образом, становится возможным аналит-зависимая активация антисмысловых механизмов против мРНК гена в клетке, поскольку стабильный РНК-ДНК-дуплекс образуется лишь в присутствии аналита.

В данной работе описывается разработка и оптимизация ДНК-конструкции на основе аналит-зависимой активации антисенс за счет использования двух коротких последовательностей Asoa и Asob, способных активировать расщепление выбранной мРНК мишени только в присутствии раковой маркерной последовательности — мРНК гена MYCN, высокоамплифицированного в клетках нейробластомы. Предварительные исследования *in vitro* с использованием синтетической РНК последовательности и *E. coli* RNase HI подтверждают описанные свойства ДНК-конструкции. Следующим этапом исследования являются эксперименты на раковых клетках, в результате которых можно будет сделать заключение об эффективности ДНК-конструкции в условиях эукариотических клеток.

Стоит отметить, что разработанную ДНК-конструкцию в будущем будет возможно адаптировать для различных целевых и маркерных мРНК, так как она состоит из легко модифицируемых олигонуклеотидов. Разработанная технология является новым подходом к использованию коротких антисенс, что позволит исследователям всего мира по-новому взглянуть на генную терапию рака.

Литература

1. Rinaldi C., Wood M. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders // *Nat Rev Neurol*. 2018. Vol. 14. P. 9–21.
2. Plashkevych O., Li Q., Chattopadhyaya J. How RNase HI (*Escherichia coli*) promoted site-selective hydrolysis works on RNA in duplex with carba-LNA and LNA substituted antisense strands in an antisense strategy context? // *Mol. BioSyst*. 2017. Vol. 13. P. 921–938.
3. Gerasimova Y. V., Peck S., Kolpashchikov D. M. Enzyme-assisted binary probe for sensitive detection of RNA and DNA // *Chem Commun (Camb)*. 2010. Vol. 46. P. 8761–8763.

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ В КИШЕЧНИКЕ ЛИЧИНОК
КОЛОРАДСКОГО ЖУКА *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*
ПРИ РАЗВИТИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ
BACILLUS THURINGIENSIS *

ALTERATIONS IN MIDGUT BACTERIAL COMMUNITY
OF *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA* DURING BACTERIAL INFECTION
BACILLUS THURINGIENSIS

Е. В. Гризанова¹, Д. С. Терещенко¹, Т. И. Криницына¹,
Г. В. Калмыкова², Н. И. Акулова², И. М. Дубовский²

¹Новосибирский государственный аграрный университет

²Сибирский федеральный научный центр
агробиотехнологий РАН, Новосибирск

E. V. Grizanova¹, D. S. Tereshenko¹, T. I. Krynytsyna¹,
G. V. Kalmykova², N. I. Akulova², I. M. Dubovskiy²

¹Novosibirsk State Agrarian University

²Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Technologies of the RAS, Novosibirsk

E-mail: katalasa_2006@yahoo.com

Insect microbiota plays an important role in the life of insects, and can also be a method for pest control in agriculture. The gut microbiota could be an additional contributor to the virulence of *Bacillus thuringiensis* bacteria. The bacterial infection with *B. thuringiensis* in the larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* leads to a qualitative and quantitative change in the composition of the intestinal microbiota, with a different effect of spores and crystalline endotoxin of bacteria on the main representatives of the microbial community. Elevated level of genes expression of pattern-recognition receptor, serine proteases and prosaposin-like protein were detected in the midgut of infected insects. A search was carried out for symbionts in the intestines of the Colorado potato beetle with the aim of modifying them for the synthesis of RNA interfering constructs that block various physiological systems of insects.

© Е. В. Гризанова, Д. С. Терещенко, Т. И. Криницына, Г. В. Калмыкова, Н. И. Акулова, И. М. Дубовский, 2020

* This work was supported by grant of President № МК-318.2020.11, and RSF № 19-16-00019.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *PINUS SYLVESTRIS* L.

BIOLOGICAL FEATURES AND MICROPROPAGATION OF *PINUS SYLVESTRIS* L.

А. С. Дәкібай¹, М. Ж. Каирова², Р. Т. Омаров¹

¹Евразийский национальный университет
им. Л. Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

²Ботанический сад, Нур-Султан, Казахстан

A. S. Dakibay¹, M. J. Kairova², R. T. Omarov¹

¹L. N. Gumilyov Eurasian national university, Nur-Sultan city, Kazakhstan

²Botanical garden, Nur-Sultan city, Kazakhstan

E-mail: markaigai@mail.ru

Аннотация

Широко распространенный вид сосны *Pinus sylvestris* L. обладает рядом преимуществ благодаря наличию фитонцидов, фиторемедиационным и другим свойствам. Изучены свойства семян, собранных в популяции сосны из Северо-Казахстанской области. В целях микроклонального размножения проведен подбор режима стерилизации почек сосны с полным исключением контаминации и использованием среды LP+6-БАП для дифференциации тканей.

Abstract

The widespread species of pine *Pinus sylvestris* L. has a number of advantages due to the presence of phytoncides, phytoremediation and other properties. The properties of seeds collected in the pine population from the North Kazakhstan region were studied. For the purpose of plant micropropagation, the selection of the sterilization mode of pine buds was carried out, with the complete elimination of contamination and the medium LP+6-BAP is used for tissue differentiation.

Из хвойных деревьев самым распространенным видом считается сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L. [1]. Известно, что в хвое сосны обыкновенной содержится большое количество фитонцидов [2]. Хвойные породы,

благодаря сложному строению своих иголок, способны задерживать частицы пыли и тяжелых металлов (16,8 кг/год), очищая воздух от выхлопных газов [3]. Вечнозеленые растения *P. sylvestris* L. положительно влияют на восстановление почв, аккумулируя кадмий, и в целом более адаптированы к загрязняющим факторам [4, 5]. Трехлетние саженцы *P. sylvestris* L. могут накапливать свинец в хвое, стволах, ветвях и максимально в корнях (156,4 мг/кг) [6]. Кроме того, древесина сосны обыкновенной характеризуется большой степенью звукопоглощаемости [7].

Таким образом, сосна обыкновенная относится экономически важному природному объекту. Классическим способом разведения хвойных растений считается вегетативное размножение, требующее больших затрат труда и времени. Черенкование растений дает хороший результат (60–70 %), но их укоренение занимает длительный период [8]. Микрклональное размножение является быстрым и эффективным методом получения здоровых растений сосны [9–11]. Целью нашей работы является изучение некоторых биологических особенностей и использование метода микрклонального размножения *P. sylvestris* L.

Определение массы 1000 семян, собранных в 2019 году в лесах Северо-Казахстанской области, проведено по общепринятой методике. Семенной материал промывали в мыльной и проточной воде, затем 20 минут обрабатывали в 1%-м растворе перманганата калия. Всхожесть определяли на 13-е сутки после проращивания семян в рулонах в четырех повторностях. В качестве эксплантов для микрклонального размножения были использованы гипокотили проростков и почки *P. sylvestris* L. Почки отобраны у визуально здоровых сосен, растущих в Ботаническом саду. Для стерилизации гипокотилей и почек сосны использован 1-, 3- и 4%-е растворы гипохлорит натрия, полученные разведением (v/v) средства «Белизна» (с содержанием 5%-го активного NaOCl). После дезинфекции растительный материал промывали стерильной водой 3–4 раза по 1–3 минуты. После дезинфекции гипокотили размером 0,5–0,7 см и почки, освобожденные чешуек, поместили на питательные среды MS (Murashige and Skoog, 1962) без фитогормонов и LP (Quirín and Leróivte, 1977) с добавлением 6-БАП (5 μ M) [9–11].

Проведено определение массы 1000 семян популяции сосны из Северной Казахстанской области, которая в среднем составила $8,507 \pm 0,019$ грамм. Всхожесть семян этой популяции в среднем была на уровне 58,5 %. После 7 дней проращивания семян длина гипокотилей составила 0,1–2,0 см.

При инкубировании на среде MS 77 гипокотилей, полученных из 7–11 дневных проростков семян, обнаружена их контаминация. Использование протокола стерилизации с обработкой в 1%-м растворе дезинфектан-

та в течение 1, 3 и 5 минут привела к инфицированию данных эксплантов до 90 %. Наряду с гипокотилиями в качестве эксплантов использованы свежесобраннные почки сосны обыкновенной, которые обрабатывали в 3- и 4%-х растворах дезинфектанта в течение 15 и 30 минут с последующей трехкратной промывкой в стерильной воде.



Инкубирование почек сосны обыкновенной на среде LP+6-БАП

При использовании метода микроклонального размножения древесно-кустарниковых и других растений особое внимание уделяется оптимизации режимов стерилизации эксплантов, собранных в различных местах их обитания. Так, при сборе материала в Ботаническом саду в Нур-Султане обнаружены различные насекомые-вредители, такие как сосновая тля (*Aphidoidea*), являющаяся переносчиком инфекций. В целом подбор способа стерилизации растительных эксплантов зависит от обеспеченности теми или иными реагентами, и часто более токсичные вещества (например, сулема или хлорид (II) ртути) заменяют на хлорсодержащие растворы [9–11]. На 5-е сутки инкубирования эксплантов, обработанных 3%-м раствором NaOCl в течение 15 минут, обнаружена контаминация почек сосны на уровне 10 % (см. рисунок). Не выявлено инфицирования при вариантах стерилизации почек в 3%-м растворе NaOCl в течение 30 минут и при 15- и 30-минутной обработке в 4%-м дезинфектанте. В сравнении с данными других исследователей стерилизация почек *P. sylvestris* L. в 3- и 4%-м растворе NaOCl с уменьшением времени экспозиции до 15 минут имеет определенное преимущество [10, 11]. В наших экспериментах, благодаря подбору оптимального режима стерилизации, обнаружено, что после 30-дневного

инкубирования эксплантов сосны обыкновенной на среде LP+6-БАП заметны морфологические изменения, свидетельствующие о дифференциации тканей. Дальнейший подбор питательных сред и оптимизация их гормонального состава для улучшения морфогенеза и ризогенеза позволит получить целые растения-регенеранты такой ценной культуры, как *P. sylvestris* L.

Литература

1. Бабич Н. Д., Соколов Н. Н., Бахтин А. А. Бесценный дар тайги. Архангельск, 1996. 224 с.
2. Ларнатович П. А., Сумина А. В. Изучение фитонцидной активности древесной растительности в городской среде (на примере г. Минусинска) // Наука без границ. 2018. № 11 (28). С. 40–44.
3. Guerrero C. C. Urban Trees and atmospheric pollutants in big cities: Effects in Madrid / Thesis (Doctoral). E.T.S. I. Montes, Forestal y del Medio Natural (UPM). 2014. 212 p.
4. Placek A., Grobelak A., Kasprzak M. Improving the phytoremediation of heavy metals contaminated soil by use of sewage sludge // Int. J. Phytoremediation. 2016. Vol. 18(6). P. 605–618.
5. Beś A., Warmiński K., Adomas B. Long-term responses of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.) to the contamination of light soils with diesel oil // International Journal of Phytoremediation. 2016. Vol. 18(6). P. 605–618.
6. Джалил Пур Бабак, Ширвани А. Использование сосны обыкновенной для фиторемедиации почвы // Лесной Вестник. 2011. № 4. С. 189–191.
7. Ivanova Y., Vitchev P., Hristodorova D. Study on the influence of some factors on the sound absorption characteristics of wood from Scots Pine // Chip and Chipless Wood-working Processes. 2018. Vol. 11(1). P. 65–72.
8. Nielsen U. B., Rasmussen H. N., Jensen M. Rooting Nordmann fir cuttings for Christmas trees // Working Papers of the Finnish Forest Research Institute. 2009. Vol. 114. P. 48–52.
9. Nunes S., Sousa D., Pereira V.T. et al. Efficient protocol for in vitro mass micropropagation of slash pine. // In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. 2018. Vol. 54. P. 175–183.
10. De Diego N., Montalbán I. A., Moncaleán P. In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees // South African Journal of Botany. 2010. Vol. 76, Iss. 1. P. 158–162.
11. Lebedev V., Shestibratov K. Effect of PGR pulse treatments and ethylene precursor and inhibitors on Scots pine micropropagation // BMC Proc. 2011. Vol. 5(Suppl 7). P. 150.

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА RANA TEMPORARIA НА РАННИХ СТАДИЯХ ЭМБРИОГЕНЕЗА *

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF RANA TEMPORARIA IN THE EARLY STAGES OF EMBRYOGENESIS

В. А. Дикая¹, А. О. Травина², Д. И. Остромышенский²,
О. И. Подгорная², А. С. Комиссаров¹

¹ Университет ИТМА,
Международный научный центр SCAMT, Санкт-Петербург
² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

V. A. Dikaya¹, A. O. Travina², D. I. Ostromyshensky²,
O. I. Podgornaya², A. S. Komissarov¹

¹ Laboratory of Applied Genomics, SCAMT, ITMO University, St. Petersburg
² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg

E-mail: animeshizik@gmail.com

Аннотация

Было показано, что повторы ДНК активно транскрибируются в раннем эмбриогенезе при активации родительского генома и при их ингибировании дальнейшее развитие эмбриона невозможно [1]. Цель данной работы — осуществить качественный и количественный анализ транскриптома ооцитов о *R. Temporaria* (взятой в качестве модельного организма) для понимания роли состава кодирующей и некодирующей частей в раннем эмбриогенезе с акцентом на повторяющиеся области.

Abstract

It has been shown that DNA repeats are actively transcribed in early embryogenesis when the parent genome is activated and when they are inhibited, further development of the embryo is impossible [1]. The aim of this work is to perform qualitative and quantitative analysis of the transcriptome of oocytes about *R. Temporaria* (taken as a model organism) to understand the role of coding and non-coding parts in early embryogenesis with an emphasis on repetitive areas.

© В. А. Дикая, А. О. Травина, Д. И. Остромышенский, О. И. Подгорная, А. С. Комиссаров, 2020

* Gratitude is expressed to the Russian Scientific Foundation for the provided material support (19-74-20102).

The reads were obtained using Illumina HiSeq 2500. The transcriptome was de novo assembled using Trinity. Abstract of encoding parts was made with the help of Trinotate and EggNOG-mapper. In addition, we compared continents with NCBI Nucleotide database. Raw reads were also compared with a rough version of the genome by the STAR program. The tandem repeats in the genome were annotated by the Tandem Repeat Finder and classified from the reads using a written script. The dispersed repeats were predicted using RepeatModeler2, the most common ones being compared with those known on the Censor website.

The 27,126 contigs were collected. With Trinotate and EggNOG 22.9 % of reads were annotated, only 9.91 % of matches were found in NCBI. However, 93.48 % of unassembled reads were localized in the draft genome (NCBI assembly: GCA_009802015.1). Repeats (satellite DNA) with sizes from 5 to 114 Mb with the highest frequency of occurrence were found, most of them are not described in databases, except for CR1 and major Satellite S1a. The high replicability of the two repeats is represented in reads of different data. At present, thanks to the results obtained, oligonucleotides for FISH and RNA-FISH mapping have been selected.

Analysis of the transcriptome of *R. Temporaria*. In the future, a manual annotation of repetitions for early embryogenesis is planned.

Литература

1. Probst A. V., Okamoto I., Casanova M. et al. A Strand-Specific Burst in Transcription of Pericentric Satellites Is Required for Chromocenter Formation and Early Mouse Development // *Developmental Cell*. 2010. Vol. 19(4).P.625–638.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПАНДЕМИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ВАКЦИН *

CONSTRUCTION OF CULTURE MEDIA FOR THE PRODUCTION OF PANDEMIC CULTURE VACCINES

Н. Б. Думченко

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

N. B. Dumchenko

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: dumchenko@vector.nsc.ru

Аннотация

Сконструированы бессывороточные питательные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 для производства живой культуральной гриппозной вакцины, не уступающие по своим характеристикам зарегистрированной бессывороточной питательной средой SFM4 MegaVir.

Abstract

Serum-free culture media VectorVac-PS2 and GPS-1 for the production of live cultural influenza vaccine have been designed, which are not inferior in their characteristics to the registered serum-free culture medium SFM4 MegaVir.

Производство живых культуральных вакцин актуально в связи с участвовавшими вспышками пандемических вирусных инфекций. Известно, что культуральные живые вакцины имеют ряд преимуществ перед другими вакцинами, таких как возможность быстрой наработки больших объемов дозы вакцины, стандартизованность производства, отсутствие в вакцине компонентов животного происхождения. Основным субстратом для культивирования вирусов являются культуры клеток, выращенные на специально подобранных питательных средах. Для повышения эффективности и рен-

© Н. Б. Думченко, 2020

* Работа выполнена при финансовой поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-1746.2018.4) и государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

табельности технологию производства можно усовершенствовать за счет разработки новых питательных сред для конкретных культур клеток. Нами сконструированы бессывороточные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 для уже зарекомендовавшей себя технологической платформы живой культуральной гриппозной вакцины. Была проведена оценка пролиферативной активности клеток MDCK в сравнении с зарегистрированной бессывороточной питательной средой SFM4 MegaVir. В культуре клеток MDCK, культивируемой в среде SFM4 MegaVir с добавлением 5- и 1%-й сыворотки, наблюдается изменение морфологии клеток: клетки увеличиваются в размерах, образуют тяжи, пролиферативная активность культуры снижена и составляла 2,0. Разработанные бессывороточные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 при культивировании клеток MDCK обеспечивают рост клеток, клетки имеют типичную для данной культуры морфологию, формируют монослой на 2–3-и сутки роста, сохраняют высокую пролиферативную активность (индекс пролиферации культуры клеток составляет 3,2 и 3,8 соответственно). При культивировании вакцинных штаммов вируса гриппа в клетках MDCK показано, что продукция вируса гриппа в культуре клеток MDCK в бессывороточных средах ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 сравнима с продукцией вируса гриппа в среде SFM4MegaVir и составляет $8,5-9 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,5 \text{ мл}$.

**ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ
ПРОТИВОВИРУСНЫХ СРЕДСТВ
НА ОСНОВЕ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК**

**PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT AND APPLICATION
OF ANTIVIRAL PREPARATIONS BASED ON DOUBLE-STRANDED RNA**

В. В. Ермолаев, Ю. С. Аликин,
Ю. В. Телегина, В. П. Клименко, М. В. Алексеева

*Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская обл.*

V. Ermolaev, Yu. S. Alikin, U. V. Telegina, V. P. Klimenko, M. V. Alekseeva

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

E-mail: ermolaev_vv@vector.nsc.ru

Аннотация

Разработана экспериментальная противовирусная композиция, включающая двуспиральную РНК бактериофага ф6 и молекулярную конструкцию на основе декстрана с включением этиотропного агента амантадина. Имеются экспериментальные данные об эффективности противовирусных препаратов на основе dsРНК, в том числе интерферон-индуцирующих и иммуномодулирующих свойствах dsРНК бактериофага ф6. В связи с этим представляется перспективным проведение исследований биологической активности разработанной композиции в целях ее возможного применения в медицине и ветеринарии.

Abstract

An experimental antiviral composition including double-stranded RNA of bacteriophage phi6 and a molecular construct based on dextran with the inclusion of the etiotropic agent amantadine has been developed. There are experimental data about the effectiveness of antiviral drugs based on dsRNA, including the data about interferon-inducing and immunomodulatory properties of dsRNA of the bacteriophage phi6. In this regard, it seems promising to conduct research on the biological activity of the developed composition with a view to its possible application in medicine and veterinary medicine.

Острые респираторные вирусные заболевания человека (в число которых входит грипп) имеют широкое распространение в мире. Как правило, под «гриппом» понимаются заболевания, вызываемые примерно 200 видами вирусов, со сходной симптоматикой. Это является одной из причин низкой эффективности вакцинации против гриппа. Также известно, что семейство коронавирусов (*Coronaviridae*) вызывают широкий спектр патологий человека и животных.

Разрабатываемые в последнее время противовирусные лекарственные препараты на основе индукторов интерферона обладают способностью подавлять широкий спектр вирусов. В число разработанных препаратов этого класса входит медицинский препарат Ридостин и его ветеринарный аналог — Вестин, разработанные с использованием двуспиральных РНК в качестве активного компонента. За основу действия данных лекарственных средств были взяты интерферон-индуцирующие механизмы действия вирусов, в роли которых они выступают, индуцируя в организме синтез интерферонов и других белков-цитокинов, в то же время не оказывая на организм разрушительного эффекта. Активация эндогенной цитокиновой сети способна формировать состояние неспецифической резистентности против вирусов, бактерий и их токсинов. Также препараты на основе РНК могут подавлять «цитокиновый шторм» вирусов, что может иметь большое значение в борьбе с коронавирусными заболеваниями. Кроме того, индукторы интерферона способны активировать фагоцитоз нейтрофилов и макрофагов, натуральные киллеры, действуют на Т- и В-клеточные звенья иммунитета. Внедрение эффективных способов применения разработанных препаратов позволяет использовать их в целях экстренной профилактики и лечения вирусных заболеваний человека и животных, коррекции иммунодефицитов, усиления вакцин.

Препараты при проведении экспериментов показывали высокую степень защиты от гриппа (сем. *Orthomyxoviridae*) у мышей (23–83 %) и птиц (65–72 %). Это, а также их способность подавлять другие вирусы различных семейств послужило основанием для их рекомендации в качестве противовирусных средств для людей. Клинические испытания инъекционной формы препарата Ридостин при гриппе и ОРВИ показали ее высокую эффективность. Через сутки после однократной инъекции температура нормализовалась у 20 % пациентов, у 60 % понижалась до уровня 37–38 °С, способствующего оптимальному развитию противoinфекционного процесса. Свою эффективность показывала и мазевая форма Ридостина. Так, интраназальное применение мази в период эпидемии оказало выраженный защитный эффект у представителей группы

риска. ОРВИ развивалось только у 3,6 %, тогда как при использовании препарата курантил, тоже индуктора интерферона, заболеваемость составила 10 %. Защитный эффект сохранялся в течение трехмесячного наблюдения за испытуемыми.

Кроме того, данные по применению противовирусного препарата Вестин (Ридостин) при ассоциативных гастроэнтеритах на примере поросят показывали, что данный препарат способен эффективно подавлять корона-вирусные и ротавирусные инфекции по сравнению с антибиотиками и химиотерапевтическими препаратами.

Другие испытания препаратов на основе РНК, в том числе Вестина, подтвердили их способность повышать эффективность вакцинации на примере птиц.

Не менее перспективными представляются разработки препаратов на основе двуспиральных РНК бактериофага фб. Данный бактериофаг содержит дсРНК, представленную тремя сегментами, размером 6370, 4100 и 3000 п.н. [1], поражает фитопатогенную бактерию *Pseudomonas phaseolicola*, непатогенную для человека и животных.

Исследования, проведенные в ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» на белых беспородных мышях, показывают, что дсРНК бактериофага фб вызывает повышение синтеза α -интерферона, максимальный уровень которого наблюдался через 5 часов после введения. И хотя к концу первых суток после инъекции уровень ИФН-альфа в крови мышей снижался, эффект оставался достаточно выраженным. Кроме того, препарат фаговой дсРНК повышал активность перитонеальных (брюшинных) макрофагов. Эффект наблюдался уже через 5 часов после введения и по-прежнему возрастал к концу первых суток [2].

Нами разработан экспериментальный композиционный препарат, включающий в себя дсРНК бактериофага фб в качестве активного компонента и молекулярную конструкцию на основе декстрана с включением в нее этиотропного агента амантадина в качестве внешней оболочки [3]. В связи с ранее установленными противовирусными и иммуномодулирующими свойствами препаратов на основе дсРНК представляется перспективным проведение исследований биологической активности данной композиции в целях возможного применения в медицине и ветеринарии.

Литература

1. Vidaver A. K., Koski R. K., Van Ethen J. L. // J. Virol. 1973. Vol. 11. No. 5. P. 799–805.
2. Ермолаев В. В., Клименко В. П., Аликин Ю. С. и др. Способ получения и иссле-

дование биологических свойств двуспиральной РНК бактериофага ф6 // Биофармацевтический журнал. 2017. Т. 9, № 3. С. 21–23.

3. Ермолаев В. В., Апалев П. В., Телегина Ю. В. и др. Способ получения композиционных препаратов на основе рибонуклеиновых кислот: сб. тезисов // Междунар. конф. молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. 23–25 окт. 2019 г. Новосибирск; Научоград Кольцово, 2019. С. 70–76.

ЭНДОФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ: ПЕРСПЕКТИВА ПОВЫШЕНИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ КОРМОВ *

ENDOPHYTIC MICROORGANISMS: PROSPECTS FOR INCREASING FEED GOOD QUALITY

А. И. Ерошин, И. И. Идиятов, А. М. Трemasова

*Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности, Казань*

A. I. Eroshin, I. I. Idiyatov, A. M. Tremasova

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan

E-mail: erosartur@yandex.ru

Аннотация

Проблема контаминации кормов микроскопическими плесневыми грибами и продуктами их жизнедеятельности в последнее время обозначилась весьма остро и является определяющим доброкачественность фактором. Среди множества методов деконтаминации преимуществ больше у биологических. По результатам исследования антагонистической активности эндофитный штамм *Bacillus subtilis* EAM11 показал высокую эффективность в отношении возбудителей фузариоза, что позволяет говорить о потенциале его использования для разработки биологического препарата, обладающего свойствами пестицида.

Abstract

The problem of fodder contamination with microscopic mold fungi and their metabolic products has recently become very acute and is a factor determining good quality. Among the many decontamination methods, biological ones have more advantages. According to the results of the study of antagonistic activity, the endophytic strain *Bacillus subtilis* EAM11 showed high efficiency against the causative agents of fusarium, which suggests the potential of using it for the development of a biological preparation with pesticide properties.

Степень контаминации растительного кормового сырья микромицетами непосредственным образом отражается на его качестве. Применение

© А. И. Ерошин, И. И. Идиятов, А. М. Трemasова, 2020

* Работа выполнена в рамках выполнения гранта МК-1582.2020.11 (соглашение № 075-15-2020-225 от 27.04.2020).

химических и физических методов обработки имеет некоторые недостатки и не проходит бесследно. В этой связи эндофитные микроорганизмы, колонизирующие те же экологические ниши, что и фитопатогены, могут служить основой для разработки безопасных эффективных препаратов биологического происхождения. В настоящей работе приведены результаты оценки антагонистической активности эндофитного штамма *Bacillus subtilis* EAM11 в отношении возбудителей фузариоза.

Исследования проводились с использованием метода встречных культур, агаровых блоков, модифицированного штриха и отсроченного антагонизма на тестовых культурах патогенов *Fusarium sporotrichioides* и *Fusarium oxysporum*. Результаты, полученные каждым из методов, взаимодополнили друг друга. С помощью метода встречных культур установлено, что исследуемый штамм обладает фунгистатическим алиментарным антагонизмом в отношении обеих тестовых культур, ширина зоны ингибирования роста мицелия составила $20,61 \pm 0,49$ мм и $27,53 \pm 0,65$ мм соответственно. Противогрибковая активность, выявленная методом агаровых блоков, в данном случае отражала способность сохранить зону нанесения, составила в отношении *F. sporotrichioides* $1,89 \pm 0,03$, *F. oxysporum* — $2,34 \pm 0,07$. Метод модифицированного штриха показал способность изолята к росту и выделению противогрибковых веществ на среде с патогеном, результат сокультуривирования культур выразался в наличии зоны задержки роста патогена, которая составила, соответственно, $12,50 \pm 0,35$ мм и $15,00 \pm 0,35$ мм. Метод отсроченного антагонизма характеризовал фунгистатическую активность веществ, выделяемых штаммом-антагонистом, результат действия которых выразался степенью ингибирования роста *F. sporotrichioides* на 81,08 %, *F. oxysporum* — 88,29 %.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм *Bacillus subtilis* EAM11 обладает достаточно высокой антагонистической активностью в отношении возбудителей фузариоза и может быть использован для разработки биологического препарата, обладающего свойствами пестицида.

CRISPR/CAS9 ОПОСРЕДОВАННЫЙ НОКАУТ ГЕНА *IFITM3* В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *

CRISPR/CAS9-MEDIATED KNOCKOUT OF *IFITM3* IN HUMAN CELLS

Н. В. Ещенко¹, М. В. Сергеева², Е. С. Журавлёв¹,
А. Б. Комиссаров², Г. А. Степанов¹

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург*

N. V. Eschenko¹, M. V. Sergeeva², E. S. Zhuravlev¹,
A. B. Komissarov², G. A. Stepanov¹

¹ *ICBFM SB RAS, Novosibirsk*
² *Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg*

E-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

Аннотация

IFITM3 является членом семейства трансмембранных белков, индуцированных интерфероном (IFITM). Эти белки играют важную роль в противовирусном ответе, ограничивая проникновение вируса в цитоплазму и его репликацию. Нокаут гена *IFITM3* способствует повышению чувствительности клеток к заражению вирусом гриппа А. Такая клеточная линия может быть использована для наработки вакцинных штаммов вируса гриппа как в научных лабораториях, так и в биотехнологическом производстве.

Abstract

IFITM3 is a member of the interferon-induced transmembrane protein (IFITM) family. These proteins play an important role in the antiviral response, limiting the penetration of the virus into the cytoplasm and virus replication. Knockout of the *IFITM3* gene increase the sensitivity of cells to infection with the influenza A virus. Such a cell line can be used to develop vaccine strains of the influenza virus both in scientific laboratories and in biotechnological production.

© Н. В. Ещенко, М. В. Сергеева, Е. С. Журавлёв, А. Б. Комиссаров, Г. А. Степанов, 2020

* Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №18-75-10069.

Целью настоящей работы является получение клеточной линии с нокаутом гена *IFITM3*, продукт которого участвует в регуляции репликации вируса гриппа А в клетках человека. Для этого была использована стратегия направленного нокаута генов с применением технологии CRISPR/Cas9 геномного редактирования.

Для нокаута были сконструированы протоспейсеры, позволяющие внести не только единичные разрывы, но и обеспечить удаление протяженных участков гена-мишени. Были получены плазмидные конструкции, содержащие последовательности выбранных протоспейсеров, и на основе фибробластов легких WI-38 VA-13 subline 2RA получены жизнеспособные и активно делящиеся моноклональные клеточные линии. Среди них были выделены те, что несут мутации, обеспечивающие сдвиг рамки считывания в гене *IFITM3*. Нокаут гена-мишени подтверждали при помощи методов ОТ-ПЦР и Вестерн-блот. Было показано, что моноклональные линии со сниженной экспрессией гена *IFITM3* демонстрируют повышенную продуктивность в отношении вируса гриппа А. Для таких клеточных линий был проведен транскриптомный анализ, подтверждающий наличие мутаций и снижение уровня экспрессии гена *IFITM3*, а также функциональный анализ генов, изменивших уровень экспрессии после заражения клеток вирусом гриппа А.

Таким образом, нами была получена клеточная линия с нокаутом гена *IFITM3* и подтверждена возможность использования нокаута генов системы регуляции противовирусного ответа для повышения продуктивности наработки вируса гриппа в клетках человека.

**ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ
ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ
ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА ***

**CHANGES IN PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY IN CORN SEEDLINGS
UNDER THE INFLUENCE OF SELENIUM NANOPARTICLES**

Е. В. Запрудская, О. В. Молчан

*Институт экспериментальной ботаники
им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

E. V. Zaprudskaya, O. V. Molchan

Institute of Experimental botany of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: zaprudskayakatya@mail.ru

Аннотация

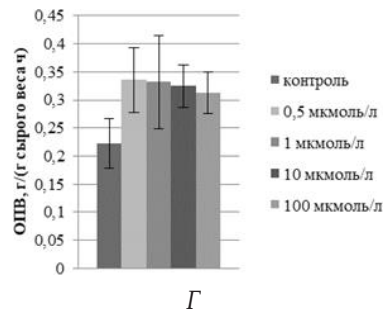
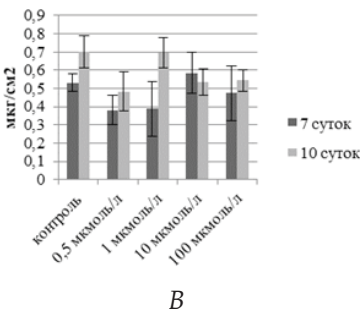
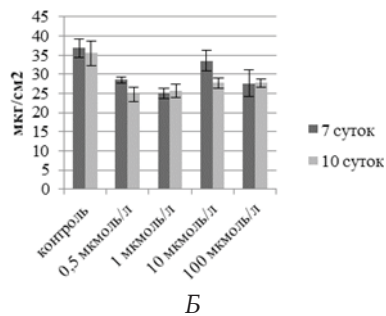
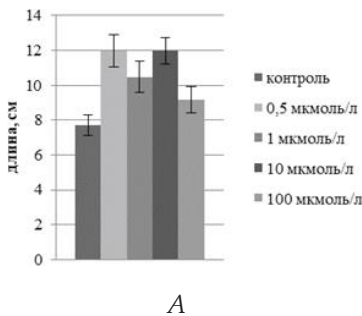
Известно, что в определенных концентрациях селен может оказывать стимулирующее действие на ряд регуляторных функций в растениях, а его избыток является токсичным. Наночастицы селена — одна из применяемых форм селена. Предполагается, что наночастицы селена в определенной концентрации будут воздействовать на фотосинтетический аппарат, регулируя, таким образом, ключевые физиологические процессы в клетках растений.

Abstract

It is known that at certain concentrations, selenium can have a stimulating effect on a number of regulatory functions in plants, and its excess is toxic. Selenium nanoparticles are one of the used forms of selenium. It is assumed that selenium nanoparticles at a certain concentration will affect the photosynthetic apparatus, thus regulating key physiological processes in plant cells.

Проростки кукурузы выращивали рулонным методом в течение 10 сут. при уровне освещения 200 мкмоль кв. м⁻² с⁻¹ и 16 ч фотопериоде в присутствии наночастиц селена в диапазоне концентраций 0,5–100 мкмоль л⁻¹.

Было показано, что при добавлении наночастиц селена происходит увеличение длины надземной части проростков (см. рисунок, А). При этом уже к 7 сут. отмечено значительное снижение содержания хлорофилла в листе (см. рисунок, Б). Также у опытных вариантов был меньше и уровень флаванолов в сравнении с растениями, выращенными без наночастиц (см. рисунок, В). Важно отметить, что под действием Se-наночастиц также была снижена водоудерживающая способность листьев проростков (см. рисунок, Г), что, скорее всего, связано с уменьшением толщины листовой пластинки. Наблюдаемые эффекты свидетельствуют о воздействии наночастиц селена на фотосинтетический аппарат и собственно процессы фотосинтеза. Одним из возможных механизмов такого воздействия может быть снижение активности АТФ-азы тилакоидных мембран в результате замещения селеном атомов серы в составе регуляторных белков. Таким образом, наблюдаемые эффекты могут быть следствием нарушения формирования протонного градиента в хлоропласте и транспорта электронов по ЭТЦ фотосинтеза.



Влияние nanoSe на длину надземной части проростков (А), содержание хлорофилла (Б), флаванолов (В) и относительную потерю воды (Г) листьями кукурузы

В результате проведенной оценки влияния наночастиц селена на физиолого-биохимические параметры проростков кукурузы показано, что наночастицы в определенном диапазоне концентраций (0,5–100 мкмоль л⁻¹) могут вызывать увеличение длины проростков, снижение уровня фотосинтетических пигментов и флаванолов, а также уменьшение водоудерживающей способности листьев проростков кукурузы. Наблюдаемые эффекты предположительно обусловлены нарушением первичных процессов фотосинтеза.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОФУНГИЦИДА ОРГАМИКА Ф ДЛЯ ТОМАТА ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА

EFFECTIVENESS OF ORGAMICA F BIOFUNGICIDE FOR PROTECTED GROUND TOMATO'S

Д. Д. Зиганшин¹, М. А. Лукьянцев², А. С. Сироткин¹

¹Казанский национальный
исследовательский технологический университет
²ООО «Органик Парк», Казань

D. D. Ziganshin ¹, M. A. Luk'jancev², A. S. Sirotkin ¹

¹FSFEI HE KNRTU
²LLC Oraganic park, Kazan,

E-mail: ziganshind@gmail.com

Аннотация

Проведено изучение эффективности биофунгицида Оргамика Ф против заболеваний томата защищенного грунта. Показано, что по эффективности против корневых гнилей фузариозной этиологии, серой гнили, а также по урожайности опытный препарат оказался эффективнее контрольного варианта и сравнимым со стандартным препаратом.

Abstract

The effectiveness of Organica F biofungicide against protected ground tomato diseases was researched. It has been shown that in terms of effectiveness against root rots of fusarious etiology, gray rot, as well as yield, the experimental substance turned out to be more effective than the control and comparable to the standard substance.

Биологические средства защиты растений являются альтернативой традиционным пестицидов, так как обладают рядом преимуществ: они экологически безопасны, не вызывают привыкания у вредителей и обладают точечной эффективностью [1].

Одним из наиболее распространенных заболеваний тепличного томата является фузариозное увядание, вызывающее раннее отмирание растений

и снижение урожая. Возбудитель болезни (*Fusarium oxysporum, f. sp. lycopersici*) развивается в ризосфере, проникает в проводящую систему растений и распространяется по сосудам, выделяя токсины, разрушающие растительные клетки [2]. Для защиты растений томата от этих патогенов применяют микробиологические препараты на основе активных штаммов микроорганизмов [3].

Так, на основе штамма *T. asperellum* ВКПМ F-1323 компанией ООО «Органик парк» производится биофунгицид Оргамика Ф, представляющий собой суспензию конидий грибной культуры, полученной в процессе культивирования.

Для проверки эффективности использования биопрепарата Оргамика Ф в защищенном грунте в качестве тестовой культуры был выбран томат гибрид F₁ Примадонна. Мелкоделяночные испытания проводились в Свободзейском районе Преднеэстрвской Молдавской Республики, в почвенно-климатической зоне, относящейся к черноземам лесостепной и степной областей.

В ходе эксперимента проводили однократную обработку при протравливании автоматической машиной для обработки семян Hege 11 (Wintersteiger AG, Австрия) и двукратную обработку опрыскиванием по вегетации ручным опрыскивателем Solo 462 (SOLO Kleinmotoren GmbH, Германия). Расход рабочей жидкости составил 1 л/т и 600 л/га. В качестве стандарта использовался препарат Фитоспорин-М, Ж (ООО «НВП «БашИнком», Россия) — биологический почвенный фунгицид на основе бактерий *Bacillus subtilis* штамма 26Д с заявленным титром культуры 1×10^9 КОЕ/мл.

Схема эксперимента представлена в табл. 1, результаты представлены в табл. 2.

Таблица 1

Схема обработки биопрепаратами томата гибрид F₁ Примадонна

№ п/п	Вариант/препарат	Норма применения	Схема применения
1	Вариант 1 / Оргамика Ф, Ж (1×10^8 КОЕ/мл)	100 мл/кг + 2,0 л/га	Протравливание + опрыскивание (двукратно)
2	Вариант 2 / Оргамика Ф, Ж (1×10^8 КОЕ/мл)	100 мл/кг + 4,0 л/га	Протравливание + опрыскивание (двукратно)
3	Стандарт / Фитоспорин-М, Ж (1×10^9 КОЕ/мл)	3 мл/кг + 1 л/га	Протравливание + опрыскивание (двукратно)
4	Контроль (без обработки)	—	—

Таблица 2

**Эффективность препарата Оргамика Ф, Ж против семенной
и почвенной инфекции на томате защищенного грунта
гибрид F₁ Примадонна**

Вариант опыта	Полевая всхожесть семян, %	<i>Fusarium spp.</i> Фузариозные корневые гнили						<i>Botrytis cinerea</i> Серая плесень						Урож-ть	
		50-е сутки		64-е сутки		71-е сутки		50-е сутки		57-е сутки		64-е сутки		кг/м ²	% к контролю
		Развитие, %	Эф-ть, %	Развитие, %	Эф-ть, %	Развитие, %	Эф-ть, %	Развитие, %	Эф-ть, %	Развитие, %	Эф-ть, %	Развитие, %	Эф-ть, %		
Вариант 1	95	3,5	63	6,5	58	13,2	42	2,0	88	3,8	82	5,0	72	20,6	107,3
Вариант 2	95	3,0	68	6,3	59	12,8	44	1,6	90	2,8	87	4,5	75	21,6	112,5
Стандарт	94,8	3,7	61	7,0	55	13,1	43	1,6	90	3,1	85	4,7	74	21,4	111,5
Контроль	93,7	9,5	–	15,4	–	22,9	–	16	–	20,7	–	18,1	–	19,2	100

Против корневых гнилей фузариозной этиологии опытный биопрепарат в варианте 2 оказался эффективнее стандарта на 7 % при развитии болезни в контроле 9,5 %. В дальнейшем при развитии болезни в контроле (15–23 %) испытываемый препарат по эффективности не уступал стандарту. Против серой гнили на 50-е сутки роста испытываемый препарат в обоих кон-

центрациях по эффективности был сравним со стандартом при развитии болезни в контроле 16 %. В дальнейшем тенденция по эффективности сохранялась при развитии болезни в контроле 20,7–18,1 %. Увеличение урожая в варианте 2 (12,5 %) было аналогичным этому показателю в стандарте (11,5 %), тогда как в варианте 1 (7,3 %) — уступало ему.

Таким образом, испытание препарата Оргамика Ф, Ж в качестве фунгицида для предпосевной обработки семян и обработки вегетирующих растений томата защищенного грунта гибрид F₁ Примадонна в условиях Приднестровской Молдавской Республики показало, что по эффективности против корневых гнилей фузариозной этиологии, серой гнили, а также по урожайности опытный препарат оказался сравнимым со стандартным препаратом Фитоспорин-М, Ж.

Литература

1. Анисимов А. И. Стратегии интегрированной защиты и широкомасштабного контроля (единство и противоречия) : мат-лы 2-го Всеросс. съезда по защите растений. Т. I. Фитосанитарное оздоровление экосистем. СПб., 2005. С. 245–247.
2. Пискун С. Г., Поликсенова В. Д., Анохина В. С. Фитотоксическая активность возбудителя фузариозного увядания томата. Минск, 2003.
3. Алексеева К. Л., Сметанина Л. Г. Биологическая защита томата от фузариозного увядания // Современные подходы и методы в защите растений. 2018. С. 13.

**АНАЭРОБНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА,
ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПРОЦЕСС СОВМЕСТНОЙ КОНВЕРСИИ
ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЫ И СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА***

**DYNAMICS OF ANAEROBIC MICROBIAL COMMUNITIES
DURING THE PROCESS OF CO-DIGESTION OF DISTILLERS GRAINS
WITH SOLUBLES AND SUGAR BEET PULP**

Э. Э. Зиганшина, Д. Е. Белостоцкий,
С. С. Булынина, П. Я. Ванков, А. М. Зиганшин

Казанский (Приволжский) федеральный университет

E. E. Ziganshina, D. E. Belostotskiy, S. S. Bulynina, P. Y. Vankov, A. M. Ziganshin

Kazan (Volga region) Federal University

E-mail: elvira.ziganshina@kpfu.ru

Аннотация

Увеличение объемов производства этилового спирта обозначило экологическую значимость проблемы переработки послеспиртовой барды во всем мире. Свекловичный жом как отход свеклосахарной промышленности также является одним из основных отходов многих регионов России. Использование данных отходов для производства биогаза путем микробной конверсии в анаэробных условиях способно снизить их негативное воздействие на окружающую среду. Результаты настоящей работы показывают, что добавление гранулированного активированного угля стимулирует синтез биометана в ходе совместной микробной конверсии послеспиртовой барды и свекловичного жома.

Abstract

The increase in the production of ethanol, including its use as a biofuel, has indicated the environmental significance of the problem of processing distillery stillage all over the world. Beet pulp as a waste of the sugar beet industry is also one of the main wastes in many regions of Russia. The use of these substrates for biogas production through microbial anaerobic conversion can reduce their negative impact on the environment. The results

© Э. Э. Зиганшина, Д. Е. Белостоцкий, С. С. Булынина, П. Я. Ванков, А. М. Зиганшин, 2020

* Работа выполнена при финансовой поддержке «Российского фонда фундаментальных исследований» в рамках научного проекта № 18-29-25058.

of this work show that the addition of granular activated carbon stimulates the synthesis of biomethane during the microbial conversion of distillers grains with solubles and sugar beet pulp.

В настоящее время во всем мире ведется интенсивная деятельность в поддержку возобновляемых источников для выработки энергии. В данном контексте процесс анаэробной микробной конверсии биомассы в биогаз является одним из выгодных технологий как с точки зрения высокой энергетической ценности, так и экологической безопасности. Сельское хозяйство и переработка продукции агропромышленного комплекса в России ежегодно производят огромное количество отходов, среди которых отходы спиртового и сахарного производства являются одними из основных.

В данной работе впервые оценен потенциал выделения метана из после-спиртовой барды и жома сахарной свеклы в мезофильных условиях. Гранулированный активированный уголь (ГАУ) протестирован в качестве агента, стимулирующего анаэробный процесс. Так, отмечено, что внесение ГАУ (5 и 10 г/л) способствовало повышению скорости синтеза биометана за счет эффективного потребления микробными сообществами образующихся органических кислот и внедрения их в метаногенез. Для инициации анаэробного процесса применяли трансформированный коровий навоз.

Структура и динамика микробных сообществ, вовлеченных в совместную конверсию тестируемых субстратов, исследованы на основе анализа гена 16S рРНК. Так, преобладающими бактериальными классами в анаэробных системах были *Clostridia* и *Bacteroidia*. Отмечено, что в реакторах, функционирующих с внесением ГАУ, наблюдалась более высокая численность родов *midas_g_2475* (*Bacteroidales*), *DMER64* (*Bacteroidales*) и синтрофных микроорганизмов рода *Syntrophomonas* (*Clostridiales*). Архейное сообщество во всех системах было представлено доминантным родом *Methanosarcina*, а также метаногенами рода *Methanoculleus*, в то время как доля представителей родов *Methanothrix* и *Methanomassiliicoccus* была выше в реакторах с внесением ГАУ. Дальнейшие исследования позволят раскрыть и применить успешные кооперации бактерий и метаноархей для эффективной анаэробной конверсии отходов.

CONTERA: ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ПАНГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

CONTERA: A TOOL FOR PREPARATION DATA FOR PANGENOMIC ANALYSIS

Д. С. Зилов, А. С. Комиссаров

*Лаборатория прикладной геномики, SCAMT,
Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

D. S. Zilov, A. S. Komissarov

Applied Genomics Laboratory, SCAMT Institute, ITMO University, St. Petersburg

E-mail: zilov@scamt-itmo.ru

Аннотация

Обычно сборщики геномов де-ново выдают по итогу сборки не цельные хромосомы, а только их части — контиги или скаффолды, которые отсортированы по длине. Тем самым сборка не является репрезентативной по отношению к реальному геному. Дальнейшая структурная аннотация дает достаточно информации о наличии или отсутствии генов, но не о их ко-локализации. Эта информация может быть полезной для предсказания функций малоизученных генов. Еще одна проблема сборщиков — отсутствие проверки на контаминации и наличие адаптеров. В процессе подготовки ДНК для секвенирования возможно загрязнение образцов, что влияет на весь дальнейший анализ. Перед проведением сборки генома из геномных прочтений удаляют адаптеры, но их удаление не всегда проходит удачно, что влияет на качество дальнейшей сборки. Мы создали Contera — инструмент для поиска контаминаций и адаптеров, ориентации и стандартизации черновых геномов. Contera написан на Python может использоваться как на Unix системах, так и с помощью веб-интерфейса. Мы предлагаем использовать инструмент для стандартизации сборок и дальнейшего использования в построении пан-геномов.

Abstract

De-novo genome assemblers frequently do not produce complete chromosomes, but only parts of them — contigs or scaffolds, which are usually sorted by the length. Thus, the assembly is not representative in relation to the real genome. Further structural annotation gives enough information about presence or absence of genes, but not about their co-

calization. This information may be useful for predicting the functions of understudied genes and may biophysics of transcription regulation. Another problem with assemblers is the lack of contamination testing and the presence of adapters. In the process of preparing DNA for sequencing, samples may be contaminated, which affects all further analysis. Adapters are removed from the reads before assembling the genome, but their removal is not always successful, which affects the quality of further assembling. We have created Contera — a tool for orientation of draft genomes, contamination and adapters detection. Contera is written on Python and can be used both on Unix systems and through the web interface. We propose to use the tool for standardization of assemblies, so that in the future it can be used to build better pan-genomes.

Methods and Algorithms

Two methods are used to determine the position and orientation of the contigs, with and without reference genome. In the first case, the contigs are aligned, sorted and oriented according to the reference genome. In the second case, when there is no reference genome, the contigs are sorted according to GC-content. Contaminants and adapters are detected by using BLAST versus all prokaryotic genomes. Based on their results, only the adapters are removed from the genome, and possible contaminations are written in a separate file.

Results

Contera analyzes one genome in an average of 20 minutes on 8 threads. As a result, the user receives files:

1. Assembling a genome sorted according to reference or GC content without adapters.
2. The list of possible contamination or genes obtained as a result of horizontal transfer.
3. File with coordinates of adapters, if any.

**ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ПРОШЕДШИХ БИОРЕМЕДИАЦИЮ И ОБОГАЩЕННЫХ
МИКРОВОДОРОСЛЬЮ *CHLORELLA VULGARIS* СТОЧНЫХ ВОД
В ГИДРОПОННОЙ СИСТЕМЕ**

**THE PROSPECT OF USING BIOREMEDIATED WASTEWATER ENRICHED
WITH MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS*
IN A HYDROPONIC SYSTEM**

А. Д. Иванов

Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар

A. D. Ivanov

Kuban State Agrarian University, Krasnodar

E-mail: Niob12345@gmail.com

Аннотация

Очистка сточных вод является важной экологической проблемой, перспективным решением которой является использование *Chlorella vulgaris*. В ходе исследования изучена возможность использования прошедших биоремедиацию сточных вод для выращивания овощных культур гидропонным способом.

Abstract

Wastewater treatment is an important environmental problem, and the use of *Chlorella vulgaris* is a promising solution. In the course of the study, the possibility of using bioremediated wastewater for growing vegetables hydroponically was studied.

Рост населения приводит к увеличению сбросов сточных вод и нарушает экологическое равновесие, а также угрожает здоровью людей. Так, жидкие бытовые отходы могут содержать возбудителей брюшного тифа, кишечной палочки, а также яйца гельминтов. И если крупные фракции можно удалить гравитационным осаждением, то биологические загрязнения требуют более глубокого подхода. Одним из решений такой проблемы является биоремедиация [1], проводимая в промышленных очистных сооружениях.

Но сточные воды, прошедшие процедуру очистки, могут использоваться и в сельском хозяйстве. Все более набирающая известность технология гидропоники [2] как нельзя лучше может быть использована в данном случае, ведь полученная в результате биоремедиации суспензия хлореллы, использованная в качестве водной среды, позволит извлечь дополнительную экономическую выгоду.

Цель данной работы — изучение возможности использования прошедших биологическую очистку сточных вод для выращивания овощей гидропонным методом.

В рамках данного исследования был проведен элементный анализ сточных вод, прошедших очистку, а также культивация овощных растений методом гидропоники с использованием трех разных водных сред, а именно: воды с микро- и макроэлементной добавкой, суспензии *Chlorella vulgaris* в сточной воде, суспензии *Chlorella vulgaris* в сточной воде и добавки.

Для выращивания была использована гидропонная система, собранная из параллельно расположенных труб с вырезами для растений, оборудованная насосом, аэратором и LED-освещением. В качестве культуры были использованы томаты черри, огурец сорта Мурашка F1 и салат латук как наиболее часто использующиеся в гидропонном производстве.

Важной чертой выращивания растений гидропонным методом является большая продуктивность, ведь в отличие от грунтового есть возможность создания так называемых вертикальных ферм, где на очень ограниченной площади умещаются десятки и сотни растений. Особенно перспективным этот факт выглядит в свете обилия сточных вод и их доступности.

Водные среды	Томат черри, г	Огурец, г	Салат латук, г
Вода с микроэлементной добавкой	38,2	59,7	263,5
Суспензия	42,5	68,6	310,4
Суспензия + добавка	45,9	72,8	328,7

Наилучший результат был получен при выращивании в смешанной среде хлорелла + микроэлементная добавка. В среднем прибавка в массе составила ~20 %, что указывает на перспективность использования очищенных сточных вод для производства сельскохозяйственной продукции.

Литература

1. Шарапова И. Э. и др. Исследование и использование микроводорослей для биоремедиации водных сред // Инновации в науке. 2012. № 13-1. С. 38–45.
2. Бабахянян М. А., Аствацатрян Н. З., Оганесян Л. Э. Возможности гидропоники в области производства экологически чистой продукции // Биол. журнал Армении. 1999. Т. 52, №. 1. С. 21–27.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОАКТИВНОСТИ
АМФИПАТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ
ПОЛИАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ ***

**SYNTHESIS AND STUDY OF BIOACTIVITY OF POLYASPARTIC ACID
AMPHIPATIC DERIVATIVES**

М. И. Камалов, А. М. Павлюк, М. В. Моисеева, Д. В. Салахиева

Казанский (Приволжский) федеральный университет

M. I. Kamalov, A. M. Pavlyuk, M. V. Moiseeva, D. V. Salakhieva

Kazan (Volga Region) Federal University

E-mail: kamalovmi@gmail.com

Аннотация

Синтезированы полиаспарагиновая кислота и ее производные с алкиламинами и флуоресцентным красителем. Различными методами охарактеризованы коллоидные свойства полипептидов и их взаимодействие с клетками млекопитающих.

Abstract

Polyaspartic acid and its derivatives with alkylamines and fluorescent dye were synthesized. Colloidal properties of the polypeptides and their interaction with mammalian cells was assessed by different techniques.

Полиаминокислоты — перспективная основа для создания биоактивных препаратов и переносчиков лекарственных средств. Полиаспарагиновую кислоту (pAsp) синтезировали методом жидкофазной термической поликонденсации L-аспарагиновой кислоты с образованием промежуточного продукта — полисукцинимида (pSI), который далее гидролизовали в щелочных условиях [1]. В реакции аминолиза pSI с алкиламинами получили амфипатические конъюгаты pAsp различной степенью модификации.

© М. И. Камалов, А. М. Павлюк, М. В. Моисеева, Д. В. Салахиева, 2020

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ №19-74-00114 и в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2013–2020 гг.

Для оценки клеточной доступности полипептида и его производных синтезировали конъюгаты с флуоресцентным красителем Lucifer yellow ethylenediamine (pAsp-LY). Структуру полученных полипептидов подтверждали методами ИК-Фурье, ЯМР-спектроскопии и флуориметрии.

Анализ коллоидных свойств полипептидов в водных растворах методом динамического рассеяния света показал, что амфипатические производные pAsp образуют анионные микро- и наноразмерные ассоциаты с повышенной полидисперсностью. Установлено, что полипептиды ассоциируют на поверхности клеток млекопитающих, усиливая их отрицательный дзета-потенциал на 4,2–5,5 мВ. По данным МТТ-теста амфипатические производные pAsp не обладают цитотоксическим эффектом в широком диапазоне концентраций (1–2000 мкг/мл). По данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии флуоресцентно-меченный конъюгат pAsp-LY проникает в клетки млекопитающих и обнаруживается в цитозоле в везикулярных структурах. Клеточное поглощение pAsp-LY было пропорционально его концентрации в среде.

Полученные результаты могут быть использованы для создания биоактивных препаратов на основе амфипатических производных pAsp, обладающих высокой биосовместимостью и доступностью для клеток млекопитающих.

Литература

1. Salakhieva D., Shevchenko V., Nemeth C. et al. Structure-biocompatibility and transfection activity relationships of cationic polyaspartamides with (dialkylamino)alkyl and alkyl or hydroxyalkyl side groups // *Int. J. Pharm.* 2017. Vol. 517(1–2). P. 234–246. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.12.007

**ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛЕКТИНОВ
БАКТЕРИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК В ПРОЦЕССАХ
ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД**

**ESTIMATION OF THE ABILITY OF BACTERIAL EXTRACELLULAR
LECTINS FOR THE FORMATION OF BIOFILMS IN THE WASTE WATER
TREATMENT**

A. V. Kobelev, S. V. Clementyev, A. S. Sirotkin, T. V. Vdovina

*Казанский национальный исследовательский
технологический университет*

A. V. Kobelev, S. V. Clementyev, A. S. Sirotkin, T. V. Vdovina

KNRTU

E-mail: alexei-ksu@mail.ru

Аннотация

Исследована способность формировать биопленки у изолята р. *Acinetobacter* на 18 часов роста под влиянием нативных растворов и суспензий бактерий *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Экспериментальные исследования показали, что совместное культивирование бактерий р. *Acinetobacter* с *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* увеличивают формирование биопленки в среднем на 66 % и 22 %, соответственно, по сравнению с контролем.

Abstract

The ability to form biofilms in the isolate of *Acinetobacter spp.* for 18 hours of growth under the influence of native solutions and suspensions of bacteria *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* was investigated. Experimental studies have shown that the co-cultivation of bacteria *Acinetobacter spp.* with *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, increased biofilm formation, on average, by 66 % and 22 %, respectively, compared to controls.

В процессе формирования биопленок, участвующих в биологической очистке сточных вод, важную роль выполняют лектины — сложные углевод-специфические белки, которые могут участвовать в агрегировании микробных клеток и их адгезионном связывании с поверхностью подложки (субстрата).

Целью данной работы являлось исследование формирования биопленок под воздействием внеклеточных лектинов культур бактерий, выделенных из сточных вод.

В работе были использованы изоляты бактерий р. *Acinetobacter*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*, взятых из коллекции микроорганизмов кафедры промышленной биотехнологии КНИТУ.

Вначале получали маточные культуры бактерий р. *Acinetobacter*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* путем периодического культивирования на МПБ в течение 18 часов. Далее выращенные клетки стерильно вносили в пробирки Эпшендорфа с питательной средой в трех вариациях: 1) контроль — без добавления нативного раствора и суспензий других бактериальных культур; 2) с добавлением нативного раствора (как источника внеклеточных лектинов) *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*; 3) с добавлением суспензий бактерий *Bacillus subtilis* и *Escherichiacoli*.

Нативные растворы получали путем трехкратного центрифугирования культуральной жидкости при 10000 об/мин в течение 10 минут.

После 18 часов микробного роста в вариациях, описанных выше, культуральную жидкость сливали, пробирки промывали физиологическим раствором и заполняли 0,1%-м водным раствором генцианвиолета. После 10 минут экспозиции раствор красителя сливали, тщательно промывали дистиллированной водой для удаления красителя, не связанного с компонентами биопленки. Экстракцию связанного красителя осуществляли этанолом. Полученные экстракты анализировали фотометрически при длине волны 570 нм.

Полученные результаты показали, что добавление к клеткам р. *Acinetobacter* нативных растворов *Bacillus subtilis* и *E. coli* обусловило увеличение способности к формированию биопленки в среднем на 15 % и 10 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что совместное культивирование клеток р. *Acinetobacter* с клетками *B. subtilis* и *E.coli* обусловило увеличение способности к формированию биопленки в среднем на 66 % и 22 % соответственно, по сравнению с контролем.

РОЛЬ L-КАРНИТИНА В СИСТЕМЕ ПОВЫШЕНИЯ ХОЗЯЙСТВЕННО-ПОЛЕЗНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЯИЧНЫХ КУР В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

THE ROLE OF L-CARNITINE IN A SYSTEM OF INCREASING ECONOMIC INDICATORS OF HENS DURING EARLY ONTOGENESIS

В. А. Корчагина, Т. О. Азарнова,
И. С. Луговая, Е. А. Золотухина, Д. В. Аншаков

*Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина, Москва*

V. A. Korchagina, T. O. Azarnova, I. S. Lygovaya,
E. A. Zolotukhina, D. V. Anshakov

FSBEI OF HE MSAVM&B — MBA named after K. I. Scriabin, Moscow

E-mail: korchagina.viktorya2014@yandex.ru

Аннотация

Предынкубационное трансвариальное использование L-карнитина определило повышение хозяйственно-полезных признаков у молодняка яичных кур в раннем онтогенезе, в частности, фиксировали увеличение живой массы, ректальной температуры, скорости оперения, эмбриональной жизнеспособности. Полученные позитивные эффекты были обусловлены снижением интенсивности липопероксидации.

Abstract

The use of L-Carnitine during pre-incubation transovarial process showed an increase of economic benefits of young hens during early ontogenesis. To be more precise, an increase in weight, rectal temperature, plumage rate, and embryonic viability were recorded. The obtained positive effects were due to a decrease in the intensity of lipid peroxidation.

Как известно, качество молодняка суточного возраста сопряжено с результативностью промышленного птицеводства. Особи, полученные из партии, где вывод цыплят яиц превосходит 78–80 %, с высокими показате-

лями живой массы и других критериев развития, являются биологически полноценными и востребованными.

Для повышения параметров развития используют различные биостимуляторы-антиоксиданты. В нашей работе будут представлены результаты исследований влияния L-карнитина на эмбриогенез яичных кур породы Декалб Уайт. Проведенная экспериментальная работа показала, что оптимальный рас-

твор изучаемого метаболита способствовал снижению интенсивности липопероксидации, что выразилось в снижении МДА на 11,4 %, ОШ в 1,5 раза при повышении АОА в 1,3 раза соответственно по сравнению с контролем. Указанное свидетельствует о снижении вероятности деструктивных и дисфункциональных явлений в клетке, ткани и организме в целом. Заявленное сопровождалось увеличением массы молодняка суточного возраста на 11 %, а среднее соотношение массы цыпленка к массе яйца составило в опытной группе 70 % и 68 % в контрольной, балльной оценки ПАСГАР и ОПТИСТАРТ на 0,3 балла, ректальной температуры на 0,37°С, эмбриональной жизнеспособности — вывод цыплят и выводимость имели преимущество относительно контроля на 12 % и 9 % соответственно (вывод и выводимость 88,89 % и 96,55 % у цыплят опытной группы против 76,96 % и 87,78 % контрольной). При этом количество отходов инкубации снизилось на всех этапах эмбриогенеза. Наиболее значимые различия фиксировали по числу «замерших», которые в опытной группе не зафиксированы, при этом «кровавые кольца» встречались в два раза реже, а «задохликов» было в три раза меньше. Также одним из показателей полноценности является наклев, который в норме происходит между тупым концом и серединой яйца, а при неправильном положении или небольшом размере эмбриона — в остром конце или в середине. На выводе наклевы осуществлялись в 50 % случаев ближе к середине против 80 % в контроле, а остальные 50 % в опытной группе имели наклевы ближе к тупому концу, что характеризовало правильность положения и крупные размеры особей, при этом цыплята были более подвижными. Наряду с этим представители опытной группы имели более высокую скорость опереяемости (более длинные маховые перья I порядка встречались в большем количестве в опытной группе, в среднем на 5,5 %), что по данным Бессарабова Б.Ф. (2015) свидетельствует о более полноценном использовании белка яйца цыпленком в эмбриогенезе. Указанные аспекты создают запас прочности для вынужденного голодания молодняка суточного возраста, что неизбежно и обусловлено производственным циклом, транспортировкой до цеха выращивания или подсобного хозяйства.

В ходе исследования нами зафиксировано, что прединкубационное использование L-карнитина имеет несомненную ценность для повышения хозяйственно-полезных показателей молодняка суточного возраста.

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА E
ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ**

**THE PRODUCTION RECOMBINANT PROTEIN E
OF YELLOW FEVER VIRUS**

Е. И. Кривошеина, М. Ю. Карташов,
Т. П. Микрюкова, С. А. Пьянков, В. А. Терновой

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

E. I. Krivosheina, M. Yu. Kartashov,
T. P. Mikryukova, S. A. Pyankov, V. A. Ternovoi

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: krivosheina_ei@vector.nsc.ru

Аннотация

Получен бактериальный штамм-продуцент рекомбинантного белка E вируса желтой лихорадки, содержащий антигенные детерминанты характерные для этого вируса, и выделен очищенный рекомбинантный антиген. На его основе сконструирована экспериментальная тест-система для выявления антивирусных антител IgG человека, которая успешно апробирована для выявления антител в сыворотках иммунизированных людей.

Abstract

We obtained a bacterial strain-producer of the recombinant protein E of the yellow fever virus containing viral epitopes and the purified recombinant antigen was isolated. On its basis the experimental EIA test system for the detection of human anti-viral IgG antibodies has been constructed which has been successfully tested for the detection of serum antibodies in immunized humans.

На территории России циркуляция вируса желтой лихорадки (ВЖЛ) не отмечена, но своевременная диагностика необходима для идентификации завозных случаев данной инфекции и оценки эффективности иммунизации вакциной против вируса желтой лихорадки. Для создания специфической иммунологической тест-системы для выявления антител против ВЖЛ

необходимо выбрать и получить вирусный антиген, который позволит максимально эффективно выявлять антивирусные антитела в организме инфицированного или вакцинированного человека. Одним из таких белков является поверхностный белок Е ВЖЛ. По литературным данным, его пространственную структуру формируют три домена, причем третий домен, формирующий иммуноглобулин-подобную структуру, несет совокупность эпитопов, обеспечивающих нейтрализацию вируса и дифференциацию для различных флавивирусов.

Цель работы — получение фрагмента рекомбинантного белка Е вируса желтой лихорадки и оценка его использования для выявления антител человека к вирусу желтой лихорадки.

Нами получена гибридная плаزمида рЕТ160-Е, содержащая фрагмент гена белка Е в бактериальной системе *E.coli*. Созданный в бактериальной системе штамм-продуцент обеспечивал получение рекомбинантного фрагмента белка Е ВЖЛ и выделение очищенного рекомбинантного антигена. Оптимизация оптимальных условий наработки рекомбинантного белка Е ВЖЛ обеспечила высокий синтез рекомбинантного белка, который достигал до 7,1 мкг/мл при пятичасовой инкубации после добавления ИПТГ.

Для определения диагностической значимости полученного рекомбинантного белка Е ВЖЛ нами был проведен ряд экспериментов с использованием ИФА для тестирования сывороток крови добровольцев, которые содержали антитела к ВЖЛ, вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ), вирусу лихорадки денге, вирусу гепатита С. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови человека, которая не содержит антител ни к одному из вышеперечисленных вирусов. Присутствие или отсутствие антител в используемых сыворотках было подтверждено коммерческими тест-системами для выявления IgG/IgM к ВКЭ, вирусу лихорадки денге, вирусу гепатита С. Результаты тестирования аффинно-очищенного рекомбинантного белка Е ВЖЛ показывают, что использование рекомбинантного аналога вирусного белка Е позволяет выявлять специфические антитела к ВЖЛ в сыворотках вакцинированных людей в экспериментальной тест-системе ИФА. При этом полученный рекомбинантный антиген не имеет перекрестных иммунных реакций с другими флавивирусами (вирусом денге, вирусом клещевого энцефалита и вирусом гепатита С). Следовательно, мы можем сделать вывод, что полученный рекомбинантный белок Е ВЖЛ можно использовать для дифференциальной иммунодиагностики с целью выявления антител к ВЖЛ.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОТРАЖЕННЫХ
И МАЛОКРАТНО РАССЕЯННЫХ ФОТОНОВ
НА ПРОЦЕСС ПОСТРОЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ
В ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ**

**STUDY OF THE INFLUENCE OF REFLECTED AND LOW SCATTERED
PHOTONS ON THE PROCESS OF CONSTRUCTION OF STRUCTURAL
IMAGES IN OPTICAL COHERENT TOMOGRAPHY**

И. В. Кулешов, В. О. Черешнев

Тамбовский государственный технический университет

I. V. Kuleshov, V. O. Chereshev

Tambov State Technical University

E-mail: vitaliy-cha1999@yandex.ru

Аннотация

Представлены результаты исследования, в ходе которого получены матрицы дисперсии структурных изображений оптического когерентного томографа биотканей человека и кровеносных сосудов *in vivo*, отражающие процессы рассеяния и отражения фотонов.

Abstract

The paper presents the results of a study in the course of which dispersion matrices of structural images of an optical coherence tomograph of human biological tissues and blood vessels *in vivo*, reflecting the processes of scattering and reflection of photons, were obtained.

Многokратное рассеивание оптического излучения, наличие спекл-шумов, а также характеристики используемого источника излучения и вида сканирования в плече образца значительно усложняют биомедицинскую визуализацию структур биообъекта при помощи ОКТ. Изучение основополагающих принципов ОКТ, в частности исследование роли отраженных и малократно рассеянных фотонов на процесс построения структурных изображений, позволит в дальнейшем усовершенствовать технические средства диагностики в офтальмологии и дерматологии [1].

Цель данной работы заключается в дифференцировании отраженных и малократно рассеянных фотонов посредством построения вариационной матрицы структурного ОКТ-изображения.

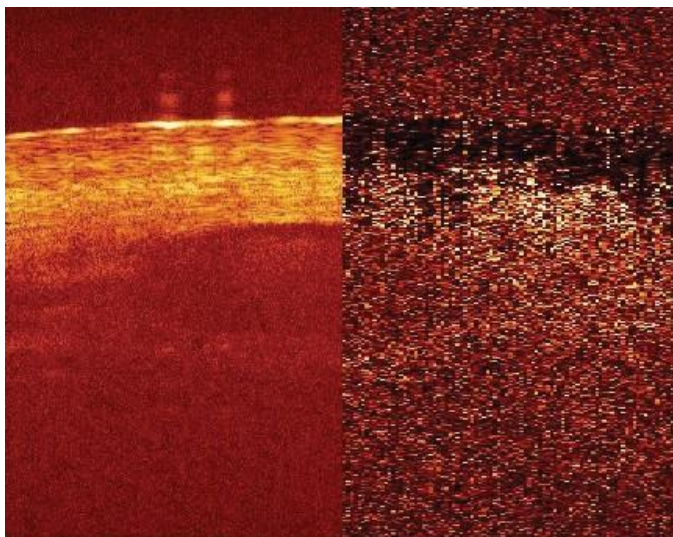
Основным объектом исследования являются структурные ОКТ-изображения кожных покровов и кровеносных сосудов человека *in vivo*, полученные при помощи нестандартной оптической системы на базе интерферометра Майкельсона.

Показатели анизотропии и коэффициентов рассеяния ткани и сосудов сильно различаются, следовательно, им соответствует различное количество актов взаимодействия, что выражается разностью между соседними А-сканами изображения [2, 3]. Для проверки данной гипотезы были рассчитаны дисперсии интенсивности соответствующих пикселей изображения.

Дисперсия была рассчитана по стандартной формуле:

$$\overline{\sigma^2} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1},$$

где n изначально равнялось 5. А-скан исходного изображения и дисперсия для пяти соседних сканов представлена на рисунке.



Структурное ОКТ-изображение кожи, сосуда и крови человека *in vivo* (слева) и изображение матрицы дисперсий (справа); размер изображения 2×2 мм

Таким образом, построение матрицы дисперсий структурных ОКТ-изображений (В-сканов) позволяет производить моделирование влияния отраженных и малократно рассеянных назад фотонов, демонстрирует возможность дифференциации различных типов структурных изображений *in vivo*, обладает потенциалом для увеличения ГКЗ и визуализации глубоких структур глубоких слоев тканей.

Литература

1. Черешнев В. О. Исследование отраженных и малократно рассеянных фотонов посредством построения матрицы дисперсий ОКТ изображений / В. О. Черешнев, С. Н. Абдулкарим, С. Г. Проскурин // Современные наукоёмкие технологии. 2019. № 12-1. С. 118–122.
2. Черешнев В. О. Дифференциация структур кожи, кровеносных сосудов и крови посредством построения вариационной матрицы ОКТ изображения / В. О. Черешнев, И. М. Романенко, И. В. Кулешов, С. Г. Проскурин // Современные наукоёмкие технологии. 2019. № 10 (Ч. 2). С. 319–323.
3. Черешнев В. О. Построение ОКТ изображений биологических тканей на основе анализа интенсивности пикселей / В. О. Черешнев, С. В. Фролов, А. Ю. Потлов, С. Г. Проскурин // Модели, системы, сети в экономике, технике, природе и обществе. 2019. № 3 (31). С. 104–112.

ВАЛИДАЦИЯ СИСТЕМЫ ВОДОПОДГОТОВКИ И ВОДЫ ИНЪЕКЦИОННОЙ В ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

VALIDATION OF WATER TREATMENT SYSTEM AND INJECTION WATER IN THE SRC VB VECTOR ROSPOTREBNADZOR

Н. С. Куцерубова, С. В. Усова, Е. С. Башкина,
М. П. Богрянцева, Е. А. Нечаева

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово

N. S. Kutserubova, S. V. Usova, E. S. Bashkina,
M. P. Bogryantseva, E. A. Nechaeva

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: kutserubova_ns@vector.nsc.ru

Аннотация

Вода занимает ключевое место в любом современном фармацевтическом производстве. И в отношении валидации подготовка воды относится к наиболее сложным и ответственным процессам, которые требуют тщательного подхода и непосредственно влияют на качество лекарственных препаратов. Согласно рекомендациям РИС, основной целью валидации системы водоподготовки является получение убедительного подтверждения, что система водоподготовки является стабильной и контролируемой.

Abstract

Water plays a key role in any modern pharmaceutical production. And in terms of validation, water preparation is one of the most complex and responsible processes that require a careful approach and directly affect the quality of drugs. According to the PIC recommendations, the main goal of water treatment system validation is to obtain convincing confirmation that the water treatment system is stable and controllable.

Целью данного исследования является получение документального подтверждения того, что система водоподготовки, применяемая в ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, является воспроизводимой.

Для получения воды для инъекций используются методы многоступенчатой очистки, обратный осмос, ионный обмен с дальнейшей поэтапной дистилляцией. По эффективности эта система не имеет равных, удаляя 99,9 % примесей.

Прежде чем валидировать процесс водоподготовки, нами были разработаны нормативные документы, валидационный мастер-план, отражающий все необходимые моменты, проводимые при валидации.

Была проведена квалификация оборудования, использованного при валидации, квалифицированы помещения, где находится система водоподготовки.

Забор проб осуществляли согласно валидационному мастер-плану в течение 5 месяцев.

При валидации были использованы лабораторные методы оценки показателей воды (электропроводность, pH, микробиологическая чистота, бактериальные эндотоксины).

Результаты проведенной работы представлены в таблице.

Наименование показателей	Контрольные точки					Среднее $M \pm m$
	1	2	3	4	5	
<i>pH (водородный показатель), ед. pH</i>	5,8	5,8	5,8	5,9	5,7	$5,8 \pm 0,03$ $p > 0,05$ при $p = 0,95$
<i>Электропроводность, мкСм/см</i>	0,61	0,60	0,66	0,74	0,77	$0,68 \pm 0,03$ $p > 0,05$ при $p = 0,95$
<i>Тяжелые металлы, %</i>	Менее 0,00001					Менее 0,00001
<i>Микробиологическая чистота</i>	Соответствует требованиям					Соответствует требованиям
<i>Бактериальные эндотоксины, ЕЭ/мл</i>	Менее 0,25 ЕЭ/мл					Менее 0,25 ЕЭ/мл
Заключение:	Вода для инъекций соответствует требованиям НД					

Контрольные анализы воды свидетельствуют, что процесс водоподготовки приводит к получению надежных и соответствующих нормам спецификации результатов, и поэтому считается валидированным.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ О-АНТИГЕН СВЯЗАННЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМАХ БАКТЕРИЙ

COMPARATIVE GENOMICS ANALYSIS OF O-ANTIGEN RELATED GENES IN PROKARYOTIC GENOMES

П. Д. Кучур, Д. С. Зилов, А. С. Комиссаров

*Лаборатория прикладной геномики, SCAMT,
Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

P. Kuchur, D. Zilov, A. Komissarov

Applied Genomics Laboratory, SCAMT, ITMO University, St. Petersburg

E-mail: chesnokova@scamt-itmo.ru

Аннотация

О-антиген бактерий является поверхностной клеточной структурой, опосредующей взаимодействие бактерий с окружающей средой, в том числе с растениями и животными [1]. В случае последних О-антиген приобретает патогенные свойства [2]. Данная работа является первым масштабным анализом всех бактериальных геномов с целью поиска генов, вовлеченных в синтез О-антигена.

Abstract

Somatic or bacterial O-antigen is a surface cell structure that provides interaction between bacteria and the environment including plants and animals [1]. In the case of animals, O-antigen acquires pathogenicity [2]. Our research is the first large-scale analysis of all bacteria sequences, which are obtained from NCBI to identify O-antigen in various taxonomic groups.

Bacterial genomes were obtained from the ftp site of the NCBI database. The size of the downloaded data was 736 billion bp, forming 19320047 fragments, of which 38725 are plasmid sequences. The obtained data were annotated with the PROKKA program. To move from the unique IDs of each fragment to a complete bacterial taxonomy, a converter was written using the ‘taxonomizr’ package of the R language. Search for the key genes involved in the synthesis of the O antigen was carried out using a Python script. The search for the key O-antigen genes (*wzx* — 54709 copies/*wzy* — 28593/*wzz* — 52561) demonstrates its

presence in 593 bacterial genera belonging to 173 families. It is noteworthy that about a third (42) of families are gram-positive, although O-antigen is typical for gram-negative bacteria. Genes involved in O-antigen biosynthesis are also found in plasmids. These plasmids are identified in *Rhizobium favelukesii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *Klebsiella variicola*. The most frequent gene is *wzxE*, which was identified in 99 plasmids of *Rhizobium leguminosarum*. In addition, the plasmids also contain single copies of the following genes: *wzxC*, *wzyE*, *wzzB*, and *wzzE*. The total number of genes for the biosynthesis of O-antigens in plasmids is 127 copies. The results obtained will serve as an aid for the study of the genetic basis for the synthesis and variability of O-antigenic structures in a wide group of prokaryotic organisms, including those not only pathogenic for humans.

References

1. Holt K. E., Lassalle F., Wyres K. L. et al. Diversity and evolution of surface polysaccharide synthesis loci in Enterobacteriales // ISME Journal. 2020. Vol. 14(7). P. 1713–1730.
2. Velichko N. S. et al. Structural and genetic characterization of the colitose-containing O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Herbaspirillum frisingense* GS-F30T // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 161. P. 891–897.

МИКРОРНК-ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СПЛАЙСИНГА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ *

microRNA-MEDIATED REGULATION OF SPLICING FOR TREATMENT OF GENETIC DISEASES

Н. А. Логвина¹, Н. Шомрон², Л. Фарберов², Т. С. Зацепин¹

¹Сколковский институт науки и техники, Москва

²Тель-Авивский университет, Израиль

N. A. Logvina¹, N. Shomron², L. Farberov², T. S. Zatsepin¹

¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

²Tel Aviv University, Israel

E-mail: n.logvina@skoltech.ru

Аннотация

Синдром Вагнера является генетическим заболеванием, которое может вызываться рядом мононуклеотидных замен в гене VCAN. Все известные мутации вызывают нарушения сплайсинга, приводящие к пропуску экзона мРНК. Это открывает возможность лечения за счет регуляции сплайсинга. Нами представлена новая система регуляции альтернативного сплайсинга с помощью пре-микроРНК и показана возможность коррекции сплайсинга мРНК гена VCAN с помощью олигонуклеотидных переключателей сплайсинга (SSO).

Abstract

Wagner's syndrome is a genetic disorder that can be caused by various SNP in the VCAN gene. In all cases described in the literature, mutations cause splicing disorders, leading to an increased level of mRNA that does not contain the required exon. This opens up the possibility of treatment by regulating splicing with therapeutic oligonucleotides. We present here a new system for regulating alternative splicing using pre-miRNAs and analyze the possibility of correcting VCAN mRNA splicing using oligonucleotide splicing switches (SSO).

© Н. А. Логвина, Н. Шомрон, Л. Фарберов, Т. С. Зацепин, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-54-06009.

Альтернативный сплайсинг, заключающийся в изменении включения или пропуска экзонов, приводит к получению разных транскриптов мРНК. В процессе сплайсинга происходит взаимодействие двух сложных РНК-белковых комплексов — сплайсосомы и «микропроцессора» — комплекса белков, участвующих в биогенезе микроРНК на ранних стадиях. При этом существуют как механизмы координации, так и конкуренции между сплайсосомой и «микропроцессором». Новый механизм регуляции сплайсинга реализуется за счет комплементарности отдельных пре-микроРНК с компонентами сплайсосомы. Взаимодействие пре-микроРНК со сплайсосомной РНК сдвигает равновесие в сторону диссоциации сплайсосомного комплекса и изменяет эффективность включения экзонов с необычно высоким участком комплементарности сплайс-сайта к U1. Такие сплайс-сайты часто оказываются малоэффективными, поскольку слишком сильное взаимодействие U1 с мРНК затрудняет конформационные перестройки в сплайсосоме и способствует исключению экзона.

Одним из генов, содержащих такой экзон, является VCAN, мутации в котором вызывают синдром Вагнера. Причиной заболевания являются мутации, затрагивающие сплайсинг экзонов 7 и 8. Для лечения этого заболевания возможна коррекция сплайсинга либо с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, либо путем регуляции описанного выше нового механизма. В данной работе предложена новая система коррекции сплайсинга с помощью микроРНК, а также изменение сплайсинга VCAN SSO олигонуклеотидами.

Литература

1. Agranat-Tamir L. et al. *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42 (7). P.4640–4651. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1413>
2. Mattioli, C. et al. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014. Vol. 5 (5). P.647–658. <https://doi.org/10.1002/wrna.1236>

**ОБНАРУЖЕНИЕ РНК SARS-CoV-2 У БОЛЬНЫХ
COVID-19 И БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МЕТОДАМИ
ЦИФРОВОЙ ПЦР И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

**DETECTION OF SARS-CoV-2 RNA FOR COVID-19 PATIENTS
AND ASYMPTOMATIC CASES OF INFECTION
BY REAL-TIME AND DIGITAL PCR**

Р. Ю. Лутковский, В. А. Терновой,
Е. П. Пономарева, А. В. Гладышева, Е. В. Чуб

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

R. Yu. Lutkovskii, V. A. Ternovoi, E. P. Ponomareva, A. V. Gladysheva, E. V. Chub

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: lutkovsky_ryu@vector.nsc.ru

Аннотация

Для выявления РНК SARS-CoV-2 нами были разработаны и использованы зарегистрированный Росздравнадзором РФ набор реагентов для ПЦР в реальном времени и лабораторная система цифровой ПЦР. Сравнение эффективности этих методов проводили на панели из 171 случайно отобранных образцов носоглоточных смывов пациентов с COVID-19. Оба метода показали свою высокую эффективность для выявления вирусной РНК, которая достигала 96,5 % для цифрового ПЦР. Полученные результаты позволяют утверждать, что метод цифровой ПЦР более эффективно выявлял вирусную РНК SARS-CoV-2 и показал свою высокую эффективность для бессимптомных пациентов.

Abstract

To detect SARS-CoV-2 RNA, we developed and used a kit for real-time PCR registered by the Federal Service for Surveillance in Healthcare of the Russian Federation and experimental digital PCR system. Laboratory testing was performed on 171 randomly selected patient samples. Both methods showed high effectiveness for detecting viral RNA, which reached 96.5 % for digital PCR. The results suggest that the digital PCR is more effectively detected viral RNA SARS-CoV-2 and showed its high effectiveness for asymptomatic patients with SARS-CoV-2 infection.

В конце 2019 года в городе Ухань в Китае началось быстрое распространение нового респираторного вирусного заболевания, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2. Особенностью новой коронавирусной инфекции (COVID-19) является возможное развитие тяжелой вирусной пневмонии с высоким уровнем летальности.

Методы ПЦР широко используются для диагностики различных вирусных заболеваний. Поэтому для выявления РНК SARS-CoV-2 нами были разработаны и использованы зарегистрированный Росздравнадзором РФ набор реагентов для ПЦР в реальном времени (qPCR) и лабораторная система цифровой ПЦР (dPCR).

Лабораторное тестирование проводилось на 171 случайно отобранных образцов носоглоточных смывов от пациентов, госпитализированных с января по апрель 2020 года. Сопоставление результатов этих двух методов показало, что при qPCR количество выявленных положительных образцов составило 109, отрицательных — 44, а сомнительных — 18. Тогда как у dPCR было обнаружено 115 положительных, 6 отрицательных и 50 сомнительных образцов соответственно. Тем самым можно утверждать, что точность метода dPCR выше, чем у qPCR, и она составила 96,5 % для dPCR и только 74,3 % qPCR. При этом результаты, полученные методом qPCR, в целом совпали с результатами dPCR. Учитывая полученные данные по сравнительному исследованию qPCR и dPCR, можно сделать вывод, что метод цифровой ПЦР позволяет выявить существенно больше положительных по SARS-CoV-2 образцов, собранных от реальных пациентов.

Далее нами была оценена концентрация вирусных частиц на различных сроках инфекционного процесса у пациентов (количество копий вирусной РНК на мкл. пробы). Для анализа были отобраны 6 пациентов, у которых забор образцов происходил в разные периоды времени заболевания. Было обнаружено, что количество вирусных частиц в момент забора образца при первичном обращении за медицинской помощью составляло около 100 копий/мкл. образца. Через двое суток концентрация вирусной РНК уменьшалась до 1 копии/мкл. У 50 пациентов, подозрительных на COVID-19, инфекция протекала в бессимптомной форме. Однако у них было обнаружено наличие вирусной РНК в носоглоточных смывах. Это могло позволять бессимптомным пациентам инфицировать окружающих и распространять инфекцию в популяции человека.

Таким образом, использование цифровой ПЦР позволило более эффективно выявлять РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных смывах человека. При этом метод оказался наиболее эффективным для выявления бессимптомных случаев коронавирусной инфекции у человека.

**РАЗРАБОТКА ПАНЕЛИ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ИММУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ОРТОПОКСВИРУСОВ
ДЛЯ ОТБОРА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

DEVELOPMENT OF A PANEL OF RECOMBINANT IMMUNODOMINANT
PROTEINS OF ORTHOPOXVIRUSES FOR SELECTION OF HIGHLY
EFFECTIVE NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES

Ю. А. Меркульева, Д. Н. Щербаков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

Iu. A. Merkuleva, D. N. Shcherbakov

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: j.a.merkulyeva@gmail.com

Аннотация

В работе впервые разработаны продуценты иммунодоминантных белков А30, В7, D8 и М1, патогенных для человека ортопоксвирусов на основе клеточных линий млекопитающих. Полученные рекомбинантные белки могут быть использованы в качестве лигандов для отбора эффективных моноклональных антител.

Abstract

In this work, mammalian cell lines producing immunodominant proteins А30, В7, D8, and M1 of orthopoxviruses pathogenic for humans have been developed for the first time. These recombinant proteins can be used as ligands for the selection of effective monoclonal antibodies.

Род *Orthopoxviruses* (OPV) включает несколько патогенных для человека вирусов: вирус натуральной оспы (VARV), осповакцины (VACV), оспы обезьян (MPXV), оспы коров (CPXV) и оспы верблюдов (CMLV) [1]. Участвовавшие вспышки заболеваний, вызванных OPV, и почти полное отсутствие популяционного иммунитета требуют разработки эффективных средств терапии и профилактики, в первую очередь — широко нейтрализующих моноклональных антител (МкАТ) и вакцин нового поколения. Показано,

что антитела против иммунодоминантных белков OPV способны защитить организм лабораторных животных от развития инфекции [2]. Поэтому первым шагом для отбора антител является получение рекомбинантных аналогов этих белков.

Целью данной работы была разработка продуцентов рекомбинантных вариантов иммунодоминантных белков OPV на основе клеток млекопитающих.

На первом этапе на основе литературных данных и информации, представленной в базе иммунных эпитопов IEDB, были выбраны четыре иммунодоминантных белка OPV.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие внеклеточные домены белков A27, B7 и L1 VARV, амплифицировали при помощи ПЦР с введением сайтов рестрикции и добавлением н. п., кодирующих His- и Avi-тэги.

Полученные фрагменты встраивали в интегративный вектор pVEAL2, обеспечивающий стабильную экспрессию генов в клетках млекопитающих.

Затем на основе сравнительного анализа первичной структуры белка D8 вирусов VARV, MPXV, VACV, CPXV и CMLV выводили усредненную аминокислотную последовательность белка и проводили оптимизацию кодонного состава. Итоговую нуклеотидную последовательность синтезировали и встраивали в вектор pVEAL2.

Далее проводили липидо-катионную трансфекцию клеток линий CHO-K1 и HEK293FT полученными плазмидами, а также селекцию положительных клонов добавлением антибиотика пурамицина. Культуры-продуценты культивировали на роллерных установках и проводили очистку культуральной жидкости, содержащей рекомбинантные белки, с помощью Ni-аффинной хроматографии.

Оценку полученных препаратов проводили с помощью белкового электрофореза по Лэмбли.

При помощи иммунологических методов было показано, что рекомбинантные белки взаимодействуют со специфическими МкАТ, полученными ранее и сыворотками крови реконвалесцентных доноров.

Литература

1. Virus taxonomy: 2017 release // ICTV. URL: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy> (дата обращения: 30.08.2020).
2. Moss B. Smallpox vaccines: Targets of protective immunity // Immunol. Rev. 2011. Vol. 239(1). P. 8–26.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОКТЕЙЛЯ БАКТЕРИОФАГОВ
ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ САЛЬМОНЕЛЛ
С ПОВЕРХНОСТИ КУРИНОГО ФИЛЕ**

USING BACTERIOPHAGE COCTAILS TO ELIMINATE SALMONELLA
FROM THE SURFACE OF CHICKEN FILLET

Т.Э. Мизаева, К.М. Багандова, А.В. Алёшкин,
И.А. Киселева, Э.Р. Зулкарнеев

*Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора*

T. E. Mizaeva, K. M. Bagandova, A. V. Aleshkin, I. A. Kiseleva, E. R. Zulkarneev

*G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute
for Epidemiology and Microbiology Rospotrebnadzor*

E-mail: toita.mizaeva@bk.ru

Аннотация

Бактерии рода *Salmonella* играют большую роль в загрязнении пищевых продуктов, инфицировании домашних птиц, скота и, как следствие, человека. Появление серотипов сальмонелл с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) оказывает большое влияние на эффективность лечения антибиотиками, а увеличение распространенности штаммов с МЛУ может привести к увеличению смертности от сальмонеллезных инфекций. Альтернативой классическим химическим агентам могут стать бактериофаги — вирусы, избирательно инфицирующие бактериальные клетки, принадлежащие к одному виду или роду с последующим лизисом бактери-и-хозяина, которые могут использоваться для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т. д. в процессе их заводской переработки, перед упаковкой полуфабрикатов и готовой к употреблению продукции.

Abstract

Salmonella spp. play an important role in food contamination, infection of poultry, livestock and, as a result, humans. The emergence of multidrug-resistant (MDR) *Salmonella* serotypes has a major impact on the effectiveness of antibiotic treatment, and an increase in the prevalence of MDR strains may lead to an increase in mortality from *Salmonella*

infections. An alternative to classical chemical agents can be bacteriophages — viruses that selectively infect bacterial cells belonging to the same species or genus, followed by lysis of the host bacterium, which can be used to decontaminate vegetables, fruits, meat, fish, etc. in the process of their factory processing, before the packaging of semi-finished products and ready-to-use products.

Дикий штамм *Salmonella* Enteritidis, выделенный на птицеводческом предприятии в 2018 году, был использован для контаминации образцов куриного филе. Три вирулентных бактериофага, активных в отношении *Salmonella*, были получены из коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского. Охлажденное куриное филе разделили на кусочки 5×5 см². Образцы в количестве 54 шт. были распределены по 18 кусочков в каждой группе. Филе контаминировали *S. Enteritidis* в титре 10^5 КОЕ/мл по 100 мкл на каждый кусочек, оставляя на 15 мин. для подсыхания. Затем опытные образцы обрабатывали коктейлем бактериофагов двумя разными разведениями: 1-ю группу в титре 10^9 БОЕ/мл, 2-ю группу в титре 10^6 БОЕ/мл, а на контрольные наносили SM буфер и растирали по всей поверхности образца. Опытные и контрольные образцы подсушивали в течение 15 мин. при комнатной температуре, герметично закрывали и закладывали на хранение при $t 4 \pm 2$ °С. Микробиологический мониторинг осуществляли в шести точках: 30 мин., 1, 2, 3, 6, 10 дней. Количество активных клеток *Salmonella* spp. определяли в соответствии с ГОСТ 31659–12 из десятикратных разведений на XLD агаре.

Коктейль бактериофагов позволил снизить количество клеток *Salmonella* в группе 1 на 3,2 log КОЕ/г (снижение более 99 %), в группе 2 на 2,1 log КОЕ/г (снижение более 99 %) по сравнению с контрольной группой в течение 24–48 часов. Используемые в эксперименте бактериофаги обладают широким спектром литической активности и эффективны на сложной поверхности с точки зрения адсорбции бактериофага на клетке-мишени.

Таким образом, полученные результаты показали, что бактериофаги в качестве как средства биоконтроля могут использоваться для существенного снижения бактериальной обсемененности сальмонеллами пищевых продуктов, в том числе куриного филе.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ *

METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES AND STUDY OF PROPERTIES

И. С. Милентьева, Л. С. Дышлюк

Кемеровский государственный университет

S. Milenteva, L. S. Dyshlyuk

Kemerovo State University

E-mail: irazumnikova@mail.ru

Аннотация

В структуре белков, которые содержатся в пищевых продуктах, обнаружены аминокислотные последовательности, имеющие соответствие с биологически активными пептидами. Разработан метод выделения и очистки биологически активных пептидов, содержащихся в гидролизатах казеина. Исследованы антиоксидантные, пребиотические свойства биологически активных пептидов, выделенных из белков молока.

Abstract

In the structure of proteins contained in food, amino acid sequences have been found that correspond to biologically active peptides. A method has been developed for the isolation and purification of biologically active peptides contained in casein hydrolysates. The antioxidant, prebiotic properties of biologically active peptides isolated from milk proteins have been studied.

На рынке биологически активных добавок в последнее время появляются БАДы на основе пептидов для профилактики гипертонии. Все эти БАДы представлены в основном импортными производителями. Поэтому производство биологически активных добавок на основе пептидов или обогащение кисломолочных продуктов, например молока, является актуальным.

© И. С. Милентьева, Л. С. Дышлюк, 2020

* Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2694.2020.4).

Интерес представляет разработка метода выделения и очистки биологически активных пептидов, содержащихся в гидролизатах казеина. Для получения очищенных биологически активных пептидов в данной работе были опробованы следующие методы: ультрафильтрация; гель-фильтрация на сефадексе G-25; последовательные стадии: ультрафильтрация, препаративный электрофорез, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография. Во всех вариантах оценку степени чистоты биологически активных пептидов проводили с помощью аналитического белкового электрофореза, масс-спектрометрии MALDI-TOF, а также аналитической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

На основании полученных результатов для выделения и очистки биологически активных пептидов из ферментативных гидролизатов казеина рекомендована следующая схема: последовательные стадии ультрафильтрации на установке МФУ-Р-45-300, препаративного электрофореза в 12,5%-м полиакриламидном геле в камере фирмы Bio-Rad и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC-20. В этом случае степень чистоты биологически активных пептидов, выделенных из трипсинового гидролизата казеина, находится в диапазоне 86,7–92,4 %; выделенных из химотрипсинового гидролизата казеина — в диапазоне 88,9–95,4 %; выделенных из термолизинового гидролизата — в диапазоне 85,2–97,6 % [1, 2].

Все полученные пептиды, выделенные из трипсинового, химотрипсинового и термолизинового гидролизатов казеина, характеризуются выраженными антиоксидантными свойствами: величина тролокс-эквивалента для биопептида состава Trp-Tre-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Leu находится в диапазоне от 487 до 1345; для биопептида состава Leu-Leu-Tyr-Glu-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Pro-Pro-Ile-Ile-Val — от 505 до 1287; для биопептида состава Tyr-Pro-Pro-Pro-Gly-Pro-Ile — от 490 до 1400; для биопептида состава Lys-Glu-Asn — от 513 до 1454; для биопептида состава Tre-Gly-Glu-Asn-His-Asp — от 475 до 1325; для биопептида состава Lys-Glu — от 521 до 1500; для биопептида состава Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu — от 509 до 1498; для биопептида состава Leu-Leu-Tyr — от 501 до 1432 [3].

Анализ пребиотической активности рассматриваемых пептидов показал, что на рост бифидобактерий наибольшее влияние оказывают пептиды состава Lys-Glu, Lys-Glu-Asn и Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu, на рост лактобацилл — пептиды состава Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu, Lys-Glu и Leu-Leu-Tyr. Показано, что значение пребиотического индекса для рассматриваемых биологически активных пептидов, выделенных из белков молока, варьирует в диапазоне от 0,95 до 1,75, следовательно, все пептиды

характеризуются высоким пребиотическим действием на микрофлору желудочно-кишечного тракта

Литература

1. Разумникова И. С. Перспективный подход к созданию продуктов специального назначения при гипертонической болезни и хронической сердечной недостаточности / О. В. Козлова, А. В. Дороганова, Г. А. Аветисян // Техника и технология пищевых производств. 2010. № 1. С. 39–42.

2. Милентьева И. С. Биологически активные молекулы молока, как перспективы будущего / И. С. Милентьева, А. А. Абрашина // Пищевые инновации и биотехнологии : мат-лы V Междунар. науч. конф. Кемерово, 2017. С. 3–4.

3. Milenteva I. S. Deriving biologically active peptides and study of their qualities / I. S. Milenteva, L. S. Dyshlyuk, A. Yu. Prosekov, O. O. Babich, M. V. Shishin // Science Evolution. 2016. Vol. 1, №. 2. P. 20–33.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА РОСТА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА rhPDGF-BB

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR rhPDGF-BB IN METHYLOTROPHIC YEAST *PICCHIA PASTORIS*

А. В. Мистерова

Вятский государственный университет, Киров

A. V. Misterova

Vyatka State University, Kirov

E-mail: zeraxtas@gmail.com

Аннотация

Фактор роста тромбоцитов ВВ человека (PDGF-BB) является мощным митогеном, индуцирующим пролиферацию и дифференцировку клеток многих тканей организма, в связи с чем рекомбинантный PDGF-BB имеет широкий потенциал для применения в медицине и науке, однако на сегодняшний день для российских пациентов не доступен ни один лекарственный препарат на основе этой молекулы. Данная работа посвящена разработке перспективной технологии получения рекомбинантного PDGF-BB, которая может значительно увеличить доступность этой молекулы как для терапевтических, так и для исследовательских целей.

Abstract

Human platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) is a powerful inductor of cell proliferation and differentiation in numerous tissues of human organism. This allows recombinant human PDGF-BB to have a wide potential of use both in research and treatment. This paper describes production technology of human recombinant platelet-derived growth factor BB using a promising host *P. pastoris*. The described technology may significantly increase availability of this molecule both for research and treatment.

Цель

На данный момент известны две технологии производства rhPDGF-BB: с использованием в качестве продуцента *E. coli* и дрожжей *S. cerevisiae*. Однако большое преимущество имеет использование в качестве продуцента

метилотрофных дрожжей *P. pastoris*: возможность секреции функционально активного целевого белка в культуральную жидкость, наличие сильного индуцибельного промотора AOX1, рост до более высоких оптических плотностей, что позволяет получать высокий выход активного целевого белка. Таким образом, целью данной работы является разработка эффективной технологии получения рекомбинантного PDGF-BB надлежащего качества для использования в дальнейших разработках.

Методы

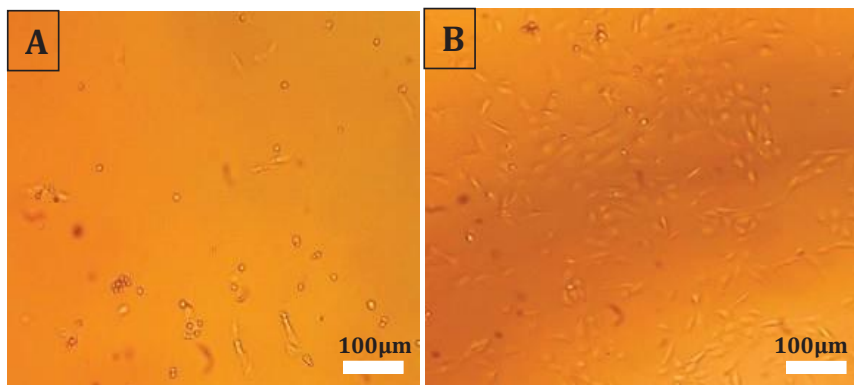
Целевой ген hPDGFB был клонирован в экспрессионный вектор pVR2Xba по рестрикционным сайтам XhoI/XbaI. Полученным вектором трансформировали клетки дрожжей *P. pastoris* X33 методом электропорации и провели скрининг полученных клонов на «дозу гена» на среде YPD с 0, 500 и 2000 мкг/мл селективного агента зеоцина. У отобранных высококопийных клонов определяли уровень экспрессии целевого гена в ходе культивирования на среде BMMY с содержанием 1 % метанола.

В ходе подбора оптимальных условий для продуцента была выбрана классическая трехступенчатая схема культивирования: выращивание инокулята на среде YPD до OD 2–6 о.е.; культивирование в колбах на среде BMY с добавлением 3 % глицерина в течение 48 ч; индукция на среде BMMY с добавлением 3 % метанола в течение 72 ч. Продуктивность при оптимальных условиях составила ок. 100 мг/л.

Разработка технологии выделения и очистки rhPDGF-BB велась в соответствии с концепцией CIPP (Strategies for protein purification, Cytiva). На стадии захвата был проведен скрининг катионообменных сорбентов с учетом следующих параметров: емкость по целевому белку, неспецифическая сорбция примесей, скорость потока; подобраны условия нанесения. В результате был выбран сильный катионообменник с синтетической матрицей. На стадии промежуточной очистки от белков продуцента (HCP) вместо общепринятой хроматографии на сорбенте Heparin HP была применена хроматография «в проскок» на анионообменном сорбенте. Содержание HCP определялось с помощью набора *Pichia pastoris* HCP ELISA Kit (Cygnus technologies, #F140).

Результаты

Получена перспективная технология производства rhPDGF-BB с эффективностью ок. 60 %. Полученный rhPDGF-BB имеет чистоту более 98 %, содержание HCP 36,6 нг/мг. Показана пролиферативная активность полученного rhPDGF-BB на клетках эндотелия пуповины (см. рисунок).



Рост клеток эндотелия пуповины: *A* — среда Эрла 199;
B — среда Эрла 199 + 40 нг/мл rhPDGF-BB

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА

OBTAINING AND CHARACTERIZING THE CELL LINE OF HUMAN GASTRIC ADENOCARCINOMA

А. А. Мурылёва¹, А. В. Слита¹, С. Л. Воробьёв²

¹ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера

² Национальный центр клинической морфологической диагностики,
Санкт-Петербург

A. A. Muryleva¹, A. V. Slita¹, S. L. Vorobyov²

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute

² National center for clinical morphological diagnostics, St. Petersburg

E-mail: anna.muryleva.a@gmail.com

Аннотация

Существует ряд опухолей, которые на ранних стадиях развития не дают выраженной клинической картины. Одним из таких новообразований является рак желудка, который в структуре смертности от злокачественных новообразований у мужчин стоит на втором месте, а у женщин — на третьем.

В связи с большой распространенностью заболевания и высокой смертностью от него актуальна разработка экспериментальных моделей. В качестве таких моделей в современной онкологии широко используются перевиваемые культуры опухолевых клеток пациента. Работа посвящена получению постоянной клеточной линии аденокарциномы желудка человека и описанию ее свойств.

Abstract

There is a number of tumors that do not have clear clinical presentation in the early stages of development. One of such neoplasms is stomach cancer which ranks second in the structure of malignant tumors mortality in men and third in women.

Due to the high prevalence of the disease and high mortality from it, the development of experimental models is relevant. Continuous cultures of patient's tumor cells are widely used as such models in modern oncology. The work is devoted to obtaining a permanent cell line of human gastric adenocarcinoma and describing its properties.

Клеточная линия аденокарциномы желудка человека была получена методом «переживающей культуры» из эксплантата опухоли пациента.

Проведенный гистологический анализ показал, что опухоль является недифференцированной аденокарциномой желудка. Иммуногистохимическое исследование клеток выявило ядерную экспрессию белка p 53, характерную для низкодифференцированных опухолей. В клетках обнаружен высокий индекс пролиферативной активности Ki67–85 %.

Клетки культивировались в флаконах (Nunk) в питательной среде DMEM(ThermoFisher) с добавлением 10%-й сыворотки плода коровы (Gibco).

Клетки демонстрируют типичную морфологию эпителиальной ткани, в процессе роста образуя плотные островки, которые в дальнейшем сливаются в монослой. Отличаются высокой степенью вакуолизации. Иммуногистохимический анализ клеточной линии показал крайне высокий индекс пролиферативной активности Ki67–95 %.

Клетки аденокарциномы желудка в большинстве случаев характеризуются высоким уровнем экспрессии цитокератинов 7 и 20. Отличительной чертой клеток опухоли и клеток культуры является отсутствие экспрессии этих белков. Это указывает на соответствие полученной культуры операционному материалу.

Клеточные кластеры представлены полиморфными, атипичными, отдельными резко анаплазированными клетками с крупными ядрами, грубым глыбчатым хроматином, выступающими ядрышками, неравномерной, частью васкуляризированной цитоплазмой, единичными перстневидными клетками и наличием патологических митозов. Эти же черты присутствуют и в операционном материале.

Для оценки чувствительности клеточной линии к противоопухолевым препаратам использовались: 5-фторурацил, цисплатин, лейковорин. Исследование показало, что линия клеток резистентна к исследуемым препаратам.

Таким образом, в ходе работы была получена постоянная клеточная линия недифференцированной аденокарциномы желудка человека кишечного типа.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГО ОТВЕТА АМФИПОД
НА ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ
В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕМОЦИТОВ *

STUDY OF AMPHIPOD IMMUNE RESPONSE TO POLYACRYLAMIDDE
GEL USING PRIMARY CULTURE OF HEMOCYTES

А. А. Назарова¹, Е. П. Шчапова¹, А. Н. Гурков^{1,2},
Е. В. Борвинская¹, М. А. Тимофеев^{1,2}

¹ Иркутский государственный университет

² Байкальский исследовательский центр, Иркутск

A. A. Nazarova¹, E. P. Shchapova¹, A. N. Gurkov^{1,2},
E. V. Borvinskaya¹, M. A. Timofeev^{1,2}

¹ Irkutsk State University

² Baikal Research Centre, Irkutsk

E-mail: annazarova1995@gmail.com

Аннотация

Была выполнена качественная и количественная оценка развития иммунного ответа гемоцитов амфипод *Ommatogammarus flavus* на полиакриламидный гель в первичной культуре. Показано отсутствие реакции гемоцитов на гель с гладкой поверхностью.

Abstract

Cellular immune response of amphipods *Ommatogammarus flavus* to polyacrylamide gel was assessed qualitatively and quantitatively in a primary culture of hemocytes. No reaction of hemocytes was observed to the gel with smooth surface.

Имплантируемые оптические микросенсоры в гидрогелевых носителях — это перспективный инструмент для регистрации физиологических параметров различных животных в динамике и *in vivo*. Важной характеристикой микросенсоров при их внедрении в живые организмы является им-

© А. А. Назарова, Е. П. Шчапова, А. Н. Гурков, Е. В. Борвинская, М. А. Тимофеев, 2020

* Работа поддержана грантом РФФ № 20-64-47011.

муногенность. В качестве перспективной основы для получения подобных сенсоров ранее был предложен полиакриламидный гель (ПААГ), который при добавлении полиэтиленгликоля удалось эффективно применять в тканях млекопитающих в течение длительного времени [1], однако на других группах животных подобных анализов не проводилось.

Целью работы являлось тестирование потенциальной иммуногенности ПААГ для ракообразных на примере байкальского эндемичного вида амфипод *Ommatogammarus flavus*. Клетки гемолимфы ракообразных — гемоциты — отвечают за инкапсуляцию инородного тела, что сопровождается их агрегацией и адсорбцией на поверхности чужеродного объекта. Ранее нами была продемонстрирована эффективность первичной культуры гемоцитов амфипод в качестве инструмента, с помощью которого может быть охарактеризована иммуногенность импланта [2], что и было использовано в данной работе для определения свойств ПААГ.

Для подготовки первичной культуры отбирали гемолимфу *O. flavus*, отмывали клетки от компонентов гуморальной фракции гемолимфы и содержали выделенные гемоциты в среде Лейбовича L-15 с добавлением 15 %-й фетальной бычьей сыворотки при температуре 4 °С (предпочитаемая для *O. flavus*). Показано, что в данных условиях до 90 % клеток сохраняет жизнеспособность в течение суток.

Подготовку ПААГ проводили в стеклянных капиллярах или металлических иглах с внутренними диаметрами 750 и 400 мкм соответственно. После извлечения из капилляров получали гладкие гелевые нити, в то время как в случае игл поверхность геля была неоднородной. Количественно реакцию гемоцитов на гель оценивали по агрегации клеток через час, 5 часов и 24 часа инкубации в культуральной среде.

Установлено, что неоднородная поверхность вызывает выраженную адсорбцию гемоцитов на геле, в то время как реакции клеток на гладкий ПААГ не наблюдали в течение суток. Таким образом, ПААГ с гладкой поверхностью является потенциально подходящей основой для подготовки имплантируемых микросенсоров, применимых в гемолимфе ракообразных.

Литература

1. Heo Y. J. et al. Long-term *in vivo* glucose monitoring using fluorescent hydrogel fibers // PNAS. 2011. Vol. 108. P. 13399–13403.
2. 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* // Polymers. 2019. Vol. 11. № 1246. P. 1–17.

**ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ PLGA, СОДЕРЖАЩИХ
ДИПРОПОКСИБАКТЕРИОПУРПУРИНИМИД,
В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

**APPLYING OF PLGA NANOPARTICLES CONTAINING
DIPROPOXYBAKTERIOPURPURINIMIDE
IN PHOTODYNAMIC THERAPY**

Е. Д. Никольская², М. Д. Сапельников¹, Н. Б. Морозова³,
Е. А. Плотникова³, А. А. Панкратов³, А. В. Ефременко^{4,5},
А. В. Панов^{1,6}, М. А. Грин¹, Р. И. Якубовская³

¹МИРЭА — Российский технологический университет, Москва

²Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

³ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва

⁴Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

⁵Биологический факультет МГУ, Москва

⁶Институт фармацевтических технологий, Москва

E. D. Nikolskaya², M. D. Sapelnikov¹, N. B. Morozova³,
E. A. Plotnikova³, A. A. Pankratov³, A. V. Efremenko^{4,5}, A. V. Panov^{1,6},
M. A. Grin¹, R. I. Yakubovskaya³

¹MIREA — Russian Technological University, Moscow

²IBCF RAS, Moscow

³FSBI NMRRC, Moscow

⁴Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

⁵Faculty of Biology MSU, Moscow

⁶Institute of Pharmaceutical Technologies, Moscow

E-mail: elenanikolskaja@gmail.com

Аннотация

Разработка новых лекарственных форм гидрофобных веществ, имеющих высокую фармакологическую активность, за последние годы стала актуальным научным направлением. Фотосенсибилизатор дипропоксикабактериопурпуринимид (ДРВПИ)

© Е. Д. Никольская, М. Д. Сапельников, Н. Б. Морозова, Е. А. Плотникова, А. А. Панкратов, А. В. Ефременко, А. В. Панов, М. А. Грин, Р. И. Якубовская, 2020

с интенсивным поглощением в ближней ИК-области спектра — перспективный препарат для фотодинамической терапии (ФДТ). Было показано селективное накопление наночастиц ДРВРІ на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) с размером менее 200 нм в клетках линии А549, а также доказана их противоопухолевая фотоиндуцированная активность при проведении ФДТ на модели саркомы мягких тканей S37, излеченность животных достигала 33 %.

Abstract

The development of new dosage forms of hydrophobic substances, having high pharmacological activity in recent years has become a relevant scientific field. The photosensitizer dipropoxybacteriopurpurinimide (DPBPI) with intense absorption in the near infrared region of the spectrum is a promising drug for photodynamic therapy (PDT). Selective accumulation of DPBPI nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA) with a size of less than 200 nm in A549 cells was shown, and their antitumor photoinduced activity was also proved during PDT on a model of soft tissue sarcoma S37, the cure rate of animals reached 33%.

Бактериохлорины интенсивно поглощают свет в ближней ИК-области спектра, их терапевтическое окно поглощения 750–850 нм расширяет возможности для лечения злокачественных новообразований за счет проникновения в ткани на глубину до 20–25 мм. Разработка метода получения и изучение терапевтического применения наночастиц (НЧ) PLGA, содержащих ДРВРІ, является актуальной задачей, поскольку НЧ смогут обеспечить пассивную селективную доставку ДРВРІ и контролируемое во времени высвобождение фотоактивной субстанции в опухолевой ткани, за счет чего будет увеличена противоопухолевая эффективность препарата и снижена его неспецифическая токсичность.

Была разработана и оптимизирована методика получения НЧ, содержащих ДРВРІ. Средний диаметр частиц составил менее 200 нм, содержание ДРВРІ — около 18 мг/г, ξ -потенциал составил -17 мВ, индекс полидисперсности не выше 0,200. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии было показано, что ДРВРІ в составе исследуемых образцов (НЧ с ДРВРІ и контрольный образец — ДРВРІ в кремифоре) интернализуется клетками мелкоклеточной карциномы легкого человека линии А549 и накапливается в цитоплазматической области. Анализ кинетики накопления ДРВРІ в клетках А549 показал увеличение времени элиминирования ДРВРІ, входящего в состав НЧ, в то время как контрольный образец элиминировался в 2 раза быстрее. Применение ДРВРІ в составе НЧ вызывало фотоиндуцированную цитотоксичность в отношении клеток А549, при этом темновая токсичность отсутствовала, в отличие от контрольного образца.

Было показано накопление НЧ с ДРВРІ в опухолевой ткани *in vivo* и практически полное выведение ДРВРІ из организма через 48 ч, а из кожи за 24 ч. На 22 сут. после сеанса ФДТ НЧ с ДРВРІ в дозе 2,5 мг/кг значение торможения роста опухоли (ТРО) у мышей с саркомой S37 составило 71 %. В течение 90 сут. у 33 % мышей не было выявлено продолженного роста опухоли, УПЖ составило 83 %, а коэффициент излечиваемости — 33 %. Таким образом, была показана эффективность применения НЧ с ДРВРІ в ФДТ.

**ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА СПОСОБНОСТЬ
КЛЕТОК-ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ИЗ ДЕРМАЛЬНОЙ
ПАПИЛЛЫ ВИБРИССЫ КРОЛИКА ИНДУЦИРОВАТЬСЯ
В НЕЙРОНАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ**

INFLUENCE OF CRYOCONSERVATION ON THE ABILITY
OF CELL-DERIVATIVES OF THE NERVOUS COMB FROM THE DERMAL
PAPILLA OF THE RABBIT VIBRISSA INDUCED IN NEURAL DIRECTION

О. Ю. Новикова, Г. А. Божок, Т. П. Бондаренко

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

O. Novikova, G. Bozhok, T. Bondarenko

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Science of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

E-mail: oyunovikova@biolik.com.ua

Аннотация

Клетки дермальной папиллы представляют собой пул клеток-производных нервного гребня, сохраняющих плюрипотентность в период постнатального онтогенеза. Они обеспечивают рост волоса и регенерацию волосяного фолликула в течение жизни, однако при помещении в условия *in vitro* проявляют широкую индукционную пластичность. В данной работе проанализирована возможность длительного хранения культур мультиклеточных сфероидов клеток дермальной папиллы кролика путем криоконсервирования. В качестве критериев оценки сохранности и стабильности исследована экспрессия основных иммуноцитохимических маркеров (β III-тубулина, виментина, глутаминсинтетазы).

Abstract

Dermal papilla (DP) cells are a pool of neural crest (NG) derived cells that stay pluripotent while postnatal ontogenesis. They provide hair growth and hair follicle regeneration throughout life, but *in vitro*, exhibit broad induction plasticity. In this work, we studied long-term storage of cultures of multicellular spheroids (MS) of rabbit DP cells by cryopreservation. The expression of the main immunocytochemical markers (β III-tubulin, vimentin, glutamine synthetase) was studied as criteria for assessing the safety and stability.

Клетки дермальной папиллы (КДП) представляют собой пул клеток-производных нервного гребня (НГ). Известно, что клетки ДП являются одним из нескольких типов клеток-производных НГ, сохраняющих плюрипотентное состояние в постнатальном онтогенезе. В условиях организма данные клетки способствуют росту волоса и регенерации структур волосяного фолликула. Также показана их способность *in vitro* осуществлять эпителио-мезенхимальный переход и индуцироваться во многих направлениях. В связи с высокой пластичностью и легкостью получения клетки ДП представляют значительный интерес для регенеративной медицины, особенно неврологии. Нами были исследованы особенности роста 2D- и 3D-культур клеток из ДП ВФ вибрисс кролика при разных условиях культивирования, а также влияние криоконсервирования на потенциал их индукции в нейрональном направлении.

Получение культуры КДП проводили методом эксплантов по собственной методике. Культивирование в средах разного состава продемонстрировало, что существует зависимость формирования монослоя или МС от наличия фетальной сыворотки телят в среде для культивирования. Во всех бессывороточных средах культура ДП была представлена мультиклеточными сфероидами, формируемыми за счет агрегации клеток.

Имунофенотипический анализ клеток ДП кролика был проведен на разных этапах культивирования: в нативной культуре и после деконсервирования. Было обнаружено положительное окрашивание исследуемых культур на два вида белков цитоскелета: β III-тубулин и виментин. После индукции в нейрональном направлении было отмечено, что уровень специфического свечения в культуре на 7-е сутки не отличался от такового в неиндуцированной культуре. На 21-е сутки наблюдалось значительное усиление свечения, увеличение зоны, занимаемой филаментами. Кроме того, происходил значительный рост отростков клеток. Содержание виментина в клетках, входящих в состав МС, было значительно выше, чем в клетках монослоя. По-видимому, это связано с участием виментина в агрегации клеток и поддержании межклеточных связей при формировании 3D-культур. Окрашивание антителами к глутаминсинтетазе показало наличие экспрессии данного белка в нативной культуре, что свидетельствует о протекании глутаматного цикла в данных клетках в норме. Аналогичная экспрессия маркеров сохранялась после криоконсервирования, таким образом, оно не оказывает влияния на конституциональные структурные особенности клеток ДП.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫБРАННЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭНДОМЕТРИТОВ У КОРОВ*

CHARACTERISTICS OF ANTAGONISTIC PROPERTIES OF LACTOBACILLI SELECTED FOR THE TREATMENT OF ENDOMETRITIS IN COWS

О. А. Новикова¹, А. С. Сюткина², Е. О. Задорина¹

¹ *Вятский государственный университет*

² *Вятская государственная сельскохозяйственная академия*

O. A. Novikova¹, A. S. Syutkina², E. O. Zadorina¹

¹ *Vyatka State University*

² *Vyatka State Agricultural Academy*

E-mail: novikovavgu@gmail.com

Аннотация

В работе проведены исследования антагонистической активности трех штаммов лактобацилл: *Lactobacillus plantarum* ПЛ-99 ВКПМ В-11747, *Lactobacillus plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *Lactobacillus buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839 в отношении выделенных изолятов лекарственно-устойчивых госпитальных инфекций и микробных составляющих экссудата гнойного-катарального эндометрита у коров.

Abstract

Studies of 3 lactobacilli strains' antagonistic activity: *lactobacillus plantarum* PL-99 VKPM B-11747, *Lactobacillus plantarum* PL-98 VKPM B-11746, *Lactobacillus buchneri* BCh-99 VKPM B-11839 have been conducted in this research on isolates of drug-resistant nosocomial infections and microbial components of the cows' purulent-catarrhal endometritis exudate.

© О. А. Новикова, А. С. Сюткина, Е. О. Задорина, 2020

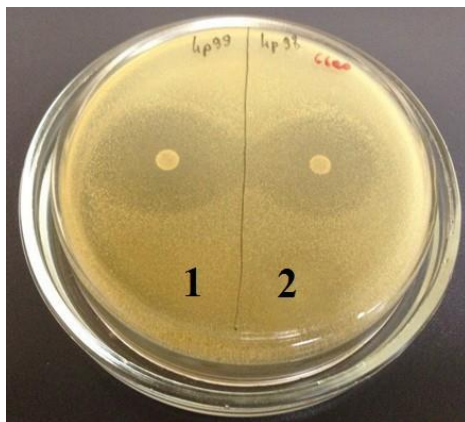
* Работа выполнена при поддержке гранта федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

В работе использовали три штамма лактобацилл: *Lactobacillus plantarum* ПЛ-99 ВКПМ В-11747, *Lactobacillus plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *Lactobacillus buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839, депонированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Антагонистическую активность штаммов лактобацилл изучали в отношении 71 штамма клинических культур возбудителей госпитальных инфекций, в том числе антибиотико-резистентных, с использованием двухслойной методики Фредерика.

Установлено, что все три штамма лактобацилл обладают высокой антагонистической активностью в отношении всех индикаторных штаммов, зона задержки роста от 15 до 60 мм и более.

Кроме того, изучали антагонистическую активность лактобактерий в отношении культур, выделенных из содержимого матки коров, больных гнойно-катаральным эндометритом. В результате исследований 30 проб гнойного экссудата были выделены и идентифицированы следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* лактозонегативная, *Salmonella sp.*, микроскопические грибы рода *Candida sp.* и *Endomices lactis*.

В результате изучения антагонистической активности исследуемых штаммов лактобацилл (см. рисунок) по методике Фредерика в отношении выделенных из гнойного экссудата микроорганизмов задержка зоны роста составляла от 20 до 60 мм, что говорит о высокой антагонистической активности лактобактерий.



Антагонистическая активность лактобацилл в отношении *Escherichia coli*: 1 — *Lactobacillus plantarum* ПЛ-99; 2 — *Lactobacillus plantarum* ПЛ-98

Полученные экспериментальные результаты показали, что три штамма: *Lactobacillus plantarum* ПЛ-99 ВКПМ В-11747, *Lactobacillus plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *Lactobacillus buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839 обладают высокой антагонистической активностью в отношении всех тест-штаммов, в том числе выделенных непосредственно от животных, больных эндометритом, что говорит о перспективности их использования при лечении данного заболевания.

**ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАРГАНЦА В СРЕДЕ
НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
SOLANUM TUBEROSUM L. IN VITRO ***

**EFFECT OF MANGANESE CONCENTRATION IN THE MEDIUM
ON GROWTH AND DEVELOPMENT DURING CULTIVATION
*SOLANUM TUBEROSUM L. IN VITRO***

О. А. Ножкина ¹, А. И. Перфильева ¹, С. С. Хуцишвили ²

¹ Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

O. A. Nozhkina ¹, A. I. Perfileva ¹, S. S. Khutsishvili ²

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

² A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS

E-mail: alla.light@mail.ru

Аннотация

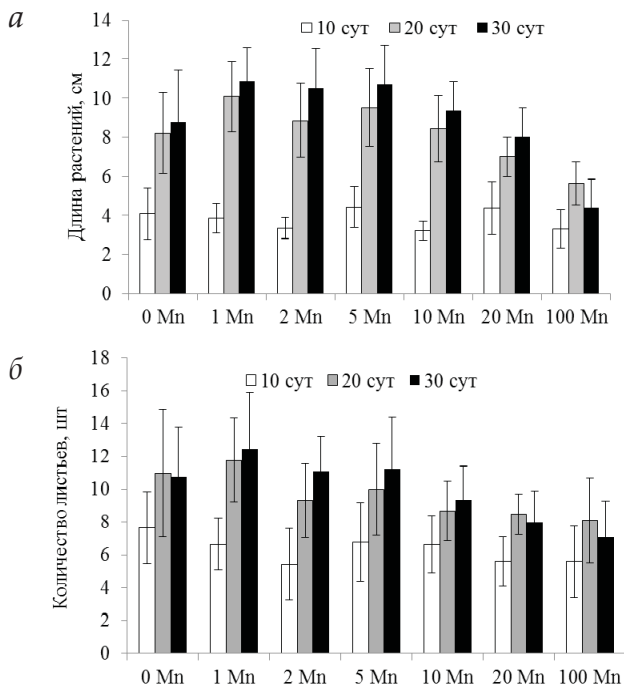
Проводили исследование влияния различных концентраций Mn в среде культивирования при выращивании картофеля *Solanum tuberosum* L. на его рост и развитие. Содержание Mn оказывает влияние на биометрические характеристики растения. При концентрации Mn, увеличенной в 100 раз по сравнению с контролем, рост растений не наблюдался. Исследование методом ЭПР показало рост интенсивности сигнала Mn с ростом концентрации соли марганца в питательной среде для культивирования растений, что говорит об увеличении концентрации металла в органах растения и подтверждается элементным анализом.

Abstract

A research was made of the effect of different concentrations of Mn in the cultivation medium when growing potatoes *Solanum tuberosum* L. on its growth and development. The Mn content influences the biometric characteristics of the plant. No plant growth was observed at a Mn concentration increased by 100 times as compared to the control. A investigation using the EPR method showed an increase in the Mn signal intensity with an increase in the concentration of manganese salt in the nutrient medium for plant cultivation,

which indicates an increase in the concentration of metal in plant organs and is confirmed by elemental analysis.

Марганец является важным микроэлементом для растений. Этот химический элемент входит в виде кофактора в состав множества ферментов, участвующих в фотосинтезе и образовании витаминов. Марганец влияет на физиолого-биохимические процессы, происходящие в растениях. Так, он способствует увеличению содержания сахаров и их оттоку из листьев, ускоряет рост растений и созревание семян. Из-за его недостатка в питательной среде растения испытывают стресс. В то же время как тяжелый металл марганец полезен растениям лишь в узком диапазоне. В настоящий момент недостаточно сведений о фитотоксичности Mn и влиянии его высоких концентраций на жизнеспособность растений. В настоящей работе проведено исследование влияния различного содержания марганца в среде при культивировании *Solanum tuberosum* L. на его рост и развитие.



Влияние различных концентраций Mn в среде при культивировании *S. tuberosum* L. на рост (а) и развитие (б) растений

Эксперименты проводили на растениях картофеля *in vitro* сорта Лукьяновский. Микрклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования на агаризованной питательной среде Мурасиге — Скуга, различающейся по содержанию соли марганца. В питательную среду элемент вводился в виде $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в расчете 0,0241 г/л (норма). Также использовались варианты питательной среды без сульфата марганца и с увеличением содержания соли в 2, 5, 10, 20 и 100 раз от нормы. Растения культивировали в факторостатных условиях в течение 30 суток, периодически измеряя длину и подсчитывая количество листьев (см. рисунок). По окончании эксперимента определяли биомассу надземной части и биомассу корней, проводили анализ элементного состава и исследование методом ЭПР.

Отсутствие соли марганца в питательной среде резко сказалось на приросте растения и биометрических параметрах в сравнении с контролем. При этом на среде со стократным превышением соли от нормы растения характеризовались отсутствием корней, увяданием листьев и медленным приростом. Биомасса надземной части растений была ниже контроля в 3 раза. Исследование тканей растений методом ЭПР показало резкий рост интенсивности спектральных линий от парамагнитного иона марганца (типичный секстет со спином $S = 5/2$) с ростом концентрации соли в среде.

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ МЕТОДА
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА**

**IMPROVEMENT OF THE CONDITIONS FOR SETTING
THE METHOD OF ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE DIAGNOSIS
OF NODULAR DERMATITIS**

Н. К. Оразымбетова, М. С. Сейсенбаева, Г. Д. Наханова,
Ж. К. Кошеметов, Б. К. Умуралиев, О. В. Червякова

*Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности, Республика Казахстан*

N. K. Orazymbetova, M. S. Seysenbayeva, G. D. Nakhanova,
Zh. K. Koshemetov, B. K. Omuraliev, O. V. Chervyakova

Research Institute of Biological Safety Problems, Kazakhstan

E-mail: niki_taraz1991@mail.ru

Аннотация

Целью исследования была усовершенствование и оптимизация условий постановки иммуноферментного анализа (ИФА), основанного на использовании рекомбинантного белка LSDV095 вируса нодулярного дерматита для обнаружения антител к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота (НД КРС) в пробах сывороток от иммунных, больных и переболевших животных. Рекомбинантный белок LSDV095 НД КРС бактериально экспрессирован в клетках *E. Coli* T7 и очищен методом металло-аффинной хроматографии. Были подобраны оптимальные рабочие разведения рекомбинантного белка и растворов для сенсibilизации лунок планшет, а также подобраны температурно-временные режимы и раствор для ИФА.

На основе рекомбинантного белка и антивидового конъюгата, приготовленного с применением антивидовых антител, был оптимизирован метод ИФА для детекции антител к НД КРС в сыворотках крови. Применение ИФА для тестирования гомологичных иммунных сывороток животных позволило выявить антитела к данному вирусу в 95 % случаев. Параллельное исследование этих сывороток в РДП показало 90%-е совпадение результатов. Метод показал специфичные

результаты, так как все исследованные негативные и гетерологичные сыворотки были отрицательными в ИФА.

Abstract

The aim of the study was to improve and optimize the conditions for setting up an enzyme immunoassay (ELISA) based on the use of recombinant protein LSDV095 of the nodular dermatitis virus for detecting antibodies to the bovine nodular dermatitis virus (bovine ND) in serum samples from immune, sick and diseased animals. Recombinant protein LSDV095 ND of cattle is bacterially expressed in E. Coli T7 cells, and purified by metal-affinity chromatography. The optimal working dilutions of recombinant protein and solutions for sensitization of the wells were selected, as well as temperature and time modes and solution for ELISA were selected.

Based on a recombinant protein and an anti-specific conjugate prepared using anti-specific antibodies, the ELISA method for detecting antibodies to bovine PD in blood sera was optimized. The use of ELISA for testing homologous immune serums of animals allowed detecting antibodies to this virus in 95 % of cases. A parallel study of these serums in DPR showed a 90 % coincidence of results. The method showed specific results, since all the studied negative and heterologous sera were negative in the ELISA.

Введение

Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (НД КРС) — инфекционная болезнь крупного рогатого скота, сопровождающаяся лихорадкой, отеком подкожной соединительной ткани и органов, образованием кожных узлов, поражением глаз, слизистой оболочки дыхательного и пищеварительного трактов [1, 2].

Мировая эпизоотическая ситуация по особо опасным вирусным болезням животных показывает, что ареал их распространения неуклонно расширяется. Это касается и такой опасной болезни для сельскохозяйственных животных, как ящур, чума мелких жвачных животных, бешенства и НД КРС [3–5].

На сегодняшний день наиболее опасными болезнями животных с точки зрения тяжести заболеваний, опасности возникновения и развития эпизоотии, а также сложности организации и проведения карантинных мероприятий является НД КРС.

Несмотря на достижения в молекулярной биологии в последние десятилетия и внедрение новых методов диагностики, таких как ПЦР, в ветеринарную практику основными и массовыми исследованиями на инфекции у животных остаются ретроспективные методы, одним из которых является ИФА. Указанный метод основан на обнаружении специфических антител в сыворотках крови животных, выявляемых при помощи антигенов, обладающих родовой специфичностью по отношению к возбудителям

инфекции. Несмотря на то что метод ИФА ранее применялся различными исследователями для диагностики НД КРС и даже были разработаны наборы для метода ИФА, эти результаты остались только на уровне научных исследований и не нашли широкого применения в ветеринарной практике. Это связано с отсутствием способа получения антигенов, с высокой специфичностью и активностью, которые необходимы для постановки ИФА [6].

Исходя из этого, необходимо было усовершенствовать условия постановки ИФА для диагностики НД КРС на основе рекомбинантного белка, который бы имел более высокую специфичность.

Материалы и методы

Штамм вируса НД КРС. В процессе проведения экспериментальных исследований был использован производственный штамм «*Dermatitisnodularis/2016/Atyrau/KZ*» вируса НД КРС.

Антиген. Для изготовления рекомбинантного антигенного белка LSDV095 вируса НД КРС использовали штамм-продуцент *E. coli* T7/pET/LSDV095. Штамм-продуцент хранили при температуре минус $(80 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в виде глицеринового стока.

Контрольные сыворотки. При постановке ИФА использовали гетерологичные сыворотки вирусов диареи и инфекционного ринотрохеита крупного рогатого скота, оспы коров, ящура типов А и О, приготовленные в НИИ проблем биобезопасности. В качестве негативного контроля использовали сыворотки крови здоровых телят.

Животные. В опытах использовали телят в возрасте 6–8 месяцев, кроликов весом 2-3 кг.

Ферменты и реагенты. В исследованиях использовали пероксидазу хрена производства фирмы «Сигма» США и 96-луночные микротитровальные пластины фирмы «Costar» (США).

Приготовление антисывороток. При получении антисыворотки к вирусу НД КРС для иммунизации использовали очищенный антиген (штамма «*Dermatitisnodularis/2016/Atyrau/KZ*»). Схема гипериммунизации телят состояла из трех введений в область предлопаточных лимфоузлов с интервалом между введениями в 1-ю неделю в комплексе с ГОА, конечная концентрация 0,1 % (2-е введение) и Montanide ISA 70 в разведении 1:1 (3-е введение). За 21 день до начала цикла гипериммунизации телятам вводили антиген в дозе по 10 см^3 с активностью 7,41 IgТЦД50/млв каждый предлопаточный лимфоузел.

Через 7 сут. после последней инъекции у телят брали пробы крови и проводили контроль антителообразования в РДП.

Получение антивидовой сыворотки. Для получения антивидовой (анти-бычьей) сыворотки в качестве антигена для иммунизации кроликов весом 2–3 кг использовали γ -глобулин нормальной сыворотки крови КРС, выделенный спиртовым методом Кона. Полученную сыворотку использовали для выделения из нее антивидовых антител.

Аффинная очистка антивидовых антител. Аффинную очистку антивидовых антител проводили с помощью 2,5%-го раствора глутарового альдегида. Преципитирующую активность препарата определяли в реакции диффузионной преципитации (РДП).

Реакция диффузионной преципитации (РДП). Преципитирующую активность вируса определяли в РДП по общепринятому методу [7].

Содержание белка определяли по методу Lowry, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma» (США) [8].

Выделение иммуноглобулинов G из специфических антисывороток. Выделение иммуноглобулинов G (ИгG) из специфических антисывороток проводили спиртовым осаждением по методу Кона [9].

Конъюгация иммуноглобулинов G с пероксидазой хрена. Конъюгацию иммуноглобулинов G с пероксидазой хрена осуществляли по методу Уилсон и Накане [10].

Результаты исследования

С целью оптимизации условий постановки непрямого варианта ИФА нами были проведены исследования по определению оптимальной концентрации рекомбинантного белка и рабочей дозы антивидового конъюгата, а также влиянию различных условий постановки ИФА на его чувствительность.

Определение оптимальной дозы для сенсibilизации рекомбинантным белком осуществляли методом их шахматного титрования со специфической сывороткой НД КРС и нормальными сыворотками, буфером для ИФА. В качестве твердой фазы использовали 96-луночные плоскодонные планшеты разных производственных фирм «Costar», «Nunc» и «TPP». По результатам ИФА среди них самым оптимальным оказался планшет фирмы «Costar». Белки испытывали в концентрациях 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 и 17,5 мкг/мл, которые растворяли в 0,01 М КББ с pH 9,5. Для разведения рекомбинантного белка вируса НД КРС при подборе концентрации, используемые для сенсibilизации лунки планшет, были испытаны следующие растворы: 0,01 М КББ с pH 9,5; 0,01 М ФБС с pH 7,4; 0,15 М хлористый натрий и 0,025 Трис HCL. Результаты исследований представлены в табл. 1 и на рисунке.

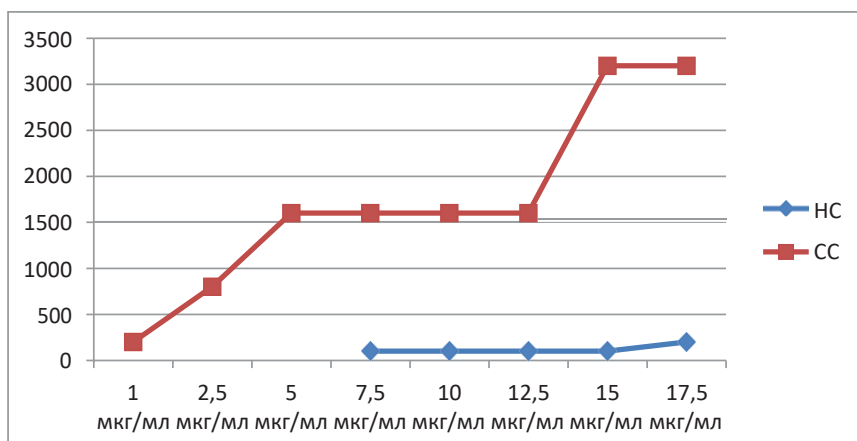
Таблица 1

**Результаты подбора концентрации белков вирусов
для сенсibilизации лунки планшет**

Антигены		Разведение специфической сыворотки							Разведение нормальной сыворотки	
Титр в РДП	Испытанные концентрации белка, мкг/мл	100	200	400	800	1600	3200	6400	100	200
	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2,5	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	7,5	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	10	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	12,5	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	15	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	17,5	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Примечания

1. «+» — положительный результат в ИФА.
2. «-» — отрицательный результат.



Результаты подбора концентрации белков вирусов
для сенсibilизации лунки планшет

Из результатов, представленных в табл. 1 и на рисунке, видно, что оптимальная концентрация рекомбинантного белка вируса НД КРС для сенсibilизации лунки планшет составляет 5,0 мкг/мл, а для приготовления разведений рекомбинантного белка приемлемым оказался солевой раствор 0,01 М КББ с рН 9,5.

В дальнейшей работе для сенсibilизации лунок планшетов нами были использовано 5,0 мкг/мл белков вируса НД КРС.

Для определения рабочего разведения антивидового иммунопероксидазного конъюгата предварительно титровали в непрямом варианте ИФА со стандартными (нормальная и специфическая) сыворотками. Предельным титром серии конъюгата считали максимальное его разведение, которое способно выявить специфических антител при отрицательном результате с нормальными сыворотками. За оптимальное рабочее разведение конъюгата принимали его восьмикратный предельный титр (табл. 2).

Таблица 2

**Определение рабочего разведения
антивидового конъюгата в ИФА при НД КРС**

Конъюгаты		Разведения специфической сыворотки							Разведение нормальной сыворотки	
Серия	Разведения конъюгата	100	200	400	800	1600	3200	6400	100	200
НД КРС										
1	50	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	100	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	200	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	400	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	800	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	1600	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3200	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	6400	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания

1. Разведения конъюгатов и сывороток выражены в обратных величинах.
2. «+» — положительный результат в ИФА.
3. «-» — отрицательный результат.

Полученные в результате проведенных исследований иммуноферментные препараты оказались активными и специфичными, предельный титр антивидового конъюгата в ИФА составил 1:3200 и рабочий титр 1:800 соответственно (см. табл. 2).

Кроме того, в ходе опыта по оптимизации условий постановки непрямого варианта ИФА на основе рекомбинантного белка для серодиагностики НД КРС испытывались разные варианты температурно-временных режимов сенсibilизации плашек диагностическими препаратами, взаимодействия компонентов реакции и времени ее учета при выявлении антител с применением различных буферных систем.

Для приготовления рабочих разведений иммуноферментных диагностических препаратов и отмывания лунок планшет испытывали следующие буферные растворы:

- физиологический раствор, содержащий твин-80 в различной концентрации (0,5 %; 1 %; 1,5 %);
- 0,01 М ФБС с pH 7,4, содержащий твин-80 в различной концентрации (0,5 %; 1 %; 1,5 %);
- 0,025 Трис HCL, содержащий твин-80 в различной концентрации (0,5 %; 1 %; 1,5 %);
- проточную воду, содержащую твин-80 в различной концентрации (0,5 %; 1 %; 1,5 %);

Для забивки свободных центров лунок планшет после их сенсibilизации иммуноглобулинами испытаны 0,25; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 % концентрации бычьего сывороточного альбумина в 0,01 М ФБС растворе.

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальным буферным раствором для разбавления рекомбинантного белка вируса НД КРС для сенсibilизации лунок планшет является 0,01 М КББ с pH 9,5. Также опытным путем установлено, что оптимальным раствором для разведения диагностических препаратов, используемых при постановке ИФА, и отмывания лунок планшет является 0,01 М ФБС с pH 7,4, содержащий твин-80 в концентрации 1 %.

Для забивки свободных центров лунок планшет с целью снятия неспецифического фонового уровня после сенсibilизации рекомбинантным белком вируса НД КРС лунки необходимо обработать 5,0%-м раствором обезжиренного сухого молока, приготовленного на 0,01 М ФБС.

Оптимизированный вариант ИФА был испытан нами для обнаружения антител к вирусу НД в сыворотках крови КРС. В качестве гетерологичных проб были исследованы пробы сывороток к вирусам диареи и инфекционного ринотрохеита крупного рогатого скота, оспы коров, ящура типов А и

О, приготовленные в НИИ проблем биобезопасности. В качестве негативного контроля использовали сыворотки крови здоровых телят.

Результаты показывают, что оптимизированный вариант ИФА с применением рекомбинантного белка и антибычьего конъюгата позволяет выявлять антитела к данному подтипу в 100 % случаях при тестировании гомологичных иммунных сывороток телят. Все исследованные отрицательные и гетерологичные сыворотки показали отрицательные результаты в ИФА.

Заключение

В результате проведенных исследований усовершенствованы условия постановки непрямого варианта ИФА для выявления антител к вирусу НД КРС. Определены оптимальные концентрации рекомбинантного белка LSDV095 вируса НД КРС для сенсibilизации лунки планшет, который составляет 5 мкг/см³. Рабочее разведение антивидового конъюгата для постановки непрямого варианта ИФА для серодиагностики нодулярного дерматита составило 1:200. Оптимизированный вариант ИФА, пригодный для выявления антител к НД КРС, показал высокую специфичность и чувствительность.

Литература

1. Гуенков В. В. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота : сб. науч. тр. ВГНКИ. М., 2005. Т. 66. С. 46–54.
2. Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Нодулярный дерматит // Вирусные болезни животных. М., 1998. С. 747–750.
3. Gibbs E. P., Taylor W. P., Lawman M. J. P., Bryant J. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus morbillivirus // Intervirology II. 1979. P. 268–274.
4. Бакулов И. А. Эпизоотическая ситуация в мире по особо опасным болезням животных к концу XX столетия : мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., 15–16 авг. 2000. Покров, 2000. С. 11–17.
5. Бакулов И. А., Котляров В. М. Мировая эпизоотическая ситуация по болезням диких животных : мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., 16–18 апр. 2002. Покров, 2002. С. 2–6.
6. Евстифеев В. В., Барбарова Л. А., Нигматуллина Д. И. и др. Усовершенствование средств ретроспективной диагностики хламидиоза животных // Ветеринарная медицина. 2013. Вып. 97.
7. Фримель Г. Иммунологические методы. М., 1987. С. 428–429.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L. et al. // J. biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
9. Фримель Г. Иммунологические методы. М., 1987. 472 с.
10. Wilson M. B., Nakane P. K. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies // Biomedical Press. 1978. P. 215–244.

**ВЛИЯНИЕ НАНОКОПОЗИТОВ СЕЛЕНА
В ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦАХ
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ***

EFFECT OF SELENIUM NANOCOMPOSITES HAVING NATURAL
POLYMERIC MATRICES ON THE VIABILITY OF RHIZOSPHERIC
BACTERIA

А. И. Перфильева¹, О. А. Ножкина¹, М. С. Карепова¹, Б. Г. Сухов²

¹ Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

A. I. Perfilova¹, O. A. Nozhkina¹, M. S. Karepova¹, B. G. Sukhov²

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

² A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS

E-mail: alla.light@mail.ru

Аннотация

Исследовано влияние нанокмозитов (НК) селена, полученных путем химического синтеза на основе природных полисахаридных матриц — арабиногалактана, крахмала и каррагинана, на жизнеспособность бактерий, выделенных из ризосферы растений. Выявлено отсутствие бактериостатической и бактерицидной активности НК селена и крахмала (НК Se/Кр), НК селена и каррагинана (НК Se/Кар) в отношении ризосферных бактерий *Rhodococcus erythropolis* и *Pseudomonas oryzae*. НК селена и арабиногалактана (НК Se/Аг) оказывал бактериостатическое и антибиопленочное воздействие на бактерию *Acinetobacter guillouiae*. Полученные данные и ранее опубликованные результаты о положительном влиянии НК селена в природных матрицах на растения открывают перспективы дальнейшего исследования эффектов НК Se/Кр и НК Se/Кар при внесении в почву в комплексе с ризосферными бактериями для повышения устойчивости культурных растений к стрессовым факторам.

© А. И. Перфильева, О. А. Ножкина, М. С. Карепова, Б. Г. Сухов, 2020

* Исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации молодых ученых — кандидатов наук № МК-1220.2019.11.

Abstract

The effect of selenium nanocomposites (NCs) obtained by chemical synthesis and based on natural polysaccharide matrices — arabinogalactan, starch and carrageenan — on the viability of bacteria isolated from the rhizosphere of plants. It has revealed that both NC of selenium and starch (NC Se/St) and NC of selenium and carrageenan (NC Se/Car) have no bacteriostatic and bactericidal activity against rhizospheric bacteria *Rhodococcus erythropolis* and *Pseudomonas oryzae*. In contrast, NC of selenium and arabinogalactan (Se/AG) has the bacteriostatic and antibiofilm effects on the bacterium *Acinetobacter guillouiae*. The data obtained and the previously published results on the positive effect of selenium NCs having natural matrices on plants offer the future prospect for further investigations of effects of NC Se/St and NC Se/Car when added to the soil in combination with rhizospheric bacteria in order to increase the resistance of cultivated plants to stress factors.

Ранее нами был исследован ряд наноконпозитов (НК) селена в природных матрицах в качестве веществ для оздоровления культурных растений от фитопатогенных бактерий. Важной характеристикой таких новых агентов является их воздействие НК на окружающую среду, в частности, на жизнеспособность представителей почвенной микрофлоры. Цель настоящей работы — изучить влияние НК селена в природных полисахаридных матрицах на жизнеспособность почвенных микроорганизмов, выделенных из ризосферы растений. Исследования проводились на трех штаммах, различающихся по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам: *Acinetobacter guillouiae*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas oryzae*. В работе использовали следующие НК: наноконпозит селена и арабиногалактана (НК Se/Аг, 6,4 % Se); наноконпозит селена и крахмала (НК Se/Кр, 12,0 % Se); наноконпозит селена и каррагинана (НК Se/Кар, 2,0 % Se). Все НК были синтезированы в Иркутском институте химии. В экспериментах использовали растворы НК с содержанием селена 0,000625 %. Для исследования наличия антибактериального эффекта НК использовали метод мутности бактериальной суспензии, метод диффузии в агар и определение интенсивности биоупленкообразования (планшетный метод).

Было выявлено, что НК Se/Аг обладал подавляющей активностью по отношению к микроорганизму *A. guillouiae*, снижал прирост в 2 раза по сравнению с контролем. Возможно, такой эффект связан с биологическими свойствами арабиногалактана. Однако НК Se/Аг не оказывал влияние на прирост суспензий родококка и псевдомонад. Вероятно, такие различия в эффекте НК связаны с различием в строении клеточной стенки бактерий, обеспечивающей устойчивость микроорганизма к стрессовому фактору.

Эксперименты демонстрируют отсутствие бактериостатического эффекта НК Se/Кр и НК Se/Кар по отношению к исследуемым микроорганизмам. НК Se/Аг на 30 % достоверно снижал биопленкообразование бактерии *A. gyl-louiae* по сравнению с контролем. Не выявлено негативного влияния НК Se/Кр на биопленкообразование ризосферных бактерий. НК Se/Кар даже стимулировал образование биопленок у бактерий *P. oryzihabitans*.

Наличие бактерицидного эффекта у НК определяли по ширине зоны ингибирования вокруг лунок на чашке со средой. Обнаружена ярко выра-
женная зона отсутствия роста *P. oryzihabitans* под влиянием НК Se/Кар, ее
величина достигала $12 \pm 0,3$ мм. Во всех остальных вариантах эксперимента
ингибирования роста бактерий не обнаружено.

Полученные новые данные и ранее опубликованные результаты о поло-
жительном влиянии этих НК на растения открывают перспективы дальней-
шего исследования внесения в почву НК Se/Кр и НК Se/Кар в комплексе
с ризосферными бактериями для повышения устойчивости культурных
растений к стрессовым факторам.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ГЕРБИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ
ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ
НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА
В ПОЧВЕННЫХ МИКРОЭКОСИСТЕМАХ ***

**STUDY OF THE DEGRADATION OF HERBICIDAL DRUGS
WITH PROLONGED ACTION BASED ON POLY-3-HYDROXIBUTIRATE
IN SOIL MICROECOSYSTEMS**

О. Д. Петровская

Сибирский федеральный университет, Красноярск

O. D. Petrovskaya

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

E-mail: olga.petrovskaya.@mail.ru

Аннотация

Разработка экологически безопасных препаратов нового поколения с контролируемым высвобождением гербицида, с использованием специального покрытия или матриц (носителей) является актуальным направлением биотехнологии в сельском хозяйстве. В данной работе матрицей для депонирования гербицида являлся биоразрушаемый полимер — поли-3-гидроксibuтират [П(ЗГБ)] с наполнителем из березовых опилок.

Abstract

The development of environmentally friendly preparations of a new generation with controlled release of the herbicide using a special coating or matrices (carriers) is an urgent area of biotechnology in agriculture. In this work, the matrix for the deposition of the herbicide was a biodegradable polymer — poly-3-hydroxybutyrate [P (3HB)] with a filler from birch sawdust.

© О. Д. Петровская, 2020

* Исследования выполнены при поддержке Проекта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализации» (Соглашение № 074-02-2018-328) в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 9 апреля 2010 г. № 220. «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские вузы».

Введение

Современное сельское хозяйство невозможно без применения средств защиты культурных растений (пестицидов). Гербициды составляют одну из самых больших групп пестицидов, используемых для защиты культурных растений от сорняков [1]. Большинство применяемых гербицидов не достигают намеченной цели, основная масса этих веществ аккумулируется в биологических объектах, загрязняет почвы, водоемы, вызывает гибель полезных организмов. Использование пестицидов для обработки сельскохозяйственных культур приводит к включению пестицидов в пищевые цепи, что определяет высокую опасность этих поллютантов для экосистем [2]. В последние годы все больше внимания уделяется разработке препаратов с контролируемым выходом активного вещества за счет депонирования их в биоразрушаемые материалы [3]. Полигидроксиалканоаты (ПГА) — биоразлагаемые полимеры микробиологического происхождения, которые являются перспективными материалами для создания таких систем. Свойства ПГА, такие как долгосрочная биоразлагаемость и возможность получения из них полимерных изделий в различных физических состояниях (порошки, растворы, расплавы), открывают им перспективу построения долгосрочных форм препаратов на их основе.

Целью работы является исследование биодеградации экспериментальных форм препаратов гербицидного действия в почвенных микрэкосистемах.

Материалы и методы

Образцы полимера П(ЗГБ) были синтезированы с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646 по авторской технологии [4].

Используемые пестициды: метрибузин [4-амино-6-трет-бутил-3-метилтио-1,2,4-триазин-5(4H)-ОН] (далее МЕТ) является системным избирательным гербицидом из группы 1,2,4-триазинонов. Трибенурон-метил [метиловый эфир 2-[6-метил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил(метил) карбомилсульфамоил] бензойной кислоты] (далее ТРИБ) представляет собой системный селективный гербицид из группы сульфонилмочевин. В качестве наполнителя полимера использовали березовые опилки, полученные измельчением древесины березы на деревообрабатывающем станке МД 250–85 (компания «СтанкоПремьер», Россия).

Для получения форм гербицидов в виде гранул использовали сырую пасту полимера, увлажненную этанолом, смешанную с березовыми опилками и гербицидом с применением гранулятора Fimar (Италия). Соотношение компонентов в формах было следующим: П(ЗГБ)/опилки/гербицид как 50/40/10 (вес.%).

Деграцию гранулированных форм исследовали в почвенных микросистемах. Для этого в контейнер с почвой помещали исследуемые формы в центр на глубину не более 1 см по три штуки в мешочке из органзы. Инкубировали в термостате при температуре 30 °С и при комнатной температуре (21–23 °С) и 50 %. После инкубационного периода гранулы изымали из почвы, очищали и высушивали. Деграцию форм оценивали каждые две недели в течение четырех месяцев весовым методом.

Для анализа почвенных проб использовали общепринятые микробиологические методы. Общую численность органотрофных бактерий определяли на мясопептонном агаре, численность микромицетов — на агаре Сабуро.

Результаты

В результате культивирования получен П(ЗГБ), имеющий следующие свойства: средневесовую молекулярную массу $M_w = 561$ кДа; полидисперсность (D) = 4,6; степень кристалличности — 76 %. В ходе эксперимента были сконструированы экспериментальные формы в виде гранул (рис. 1), содержащие П(ЗГБ)/березовые опилки/гербицид (МЕТ или ТРИБ) в соотношении 50/40/10 %. Масса гранул составляла 5–6 мг. Результаты деграции экспериментальных форм представлены на рис. 2. Исследование биоразрушения экспериментальных форм в течение длительного эксперимента (четыре месяца), показало их медленную деграцию и длительное функционирование в почве. Остаточная масса гранул составила около 75 % от изначального веса и не зависела от режима инкубации и вида депонированного гербицида.



Рис. 1. Фото экспериментальных форм

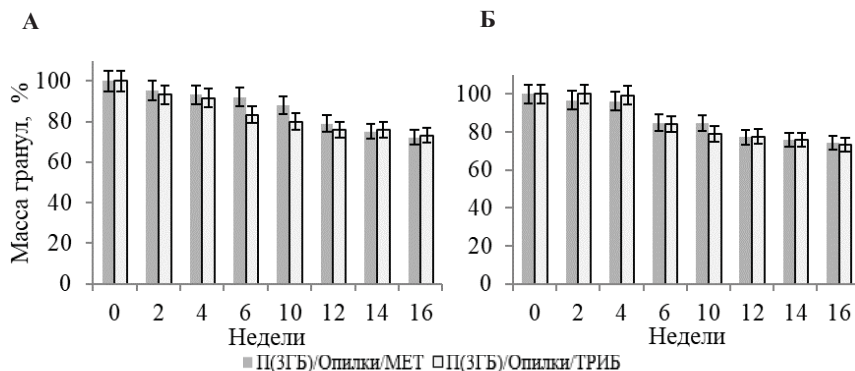


Рис. 2. Динамика изменения массы гранул П(ЗГБ)/Опилки/МЕТ и П(ЗГБ)/Опилки/ТРИБ в зависимости от условий инкубации: А — инкубирование при комнатной температуре; Б — инкубирование в термостате при 29 °С

В данном исследовании получены и охарактеризованы препараты экспериментальных форм метрибузина и трибенурон-метила, внедренных в матрицу разлагаемого поли-3-гидроксибутирата, смешанного с древесными опилками. Исследуемые препараты обладали длительным периодом биодеградации в почвенных микросистемах, что является важным свойством для препаратов пролонгированного действия.

Литература

1. Wang Y., Qian C., Yan X., Liu H. Preparation and characterization of controlled-release poly (melamine-formaldehyde) microcapsules filled with 2, 4-D isooctyl ester // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2017. Vol. 66, № 18. P. 963–969.
2. Roy A., Singh S. K., Bajpai J., Bajpai A. K. Controlled pesticide release from biodegradable polymers // *Central European Journal of Chemistry*. 2014. Vol. 12. Iss. 4. P. 453–469.
3. Shershneva A. M., Murueva A. V., Zhila N. O., Volova T. G. Antifungal activity of РЗНВ microparticles containing tebuconazole // *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2019. P.196–204.
4. Киселев Е. Г., Демиденко А. В., Барановский С. В., Волова Т. Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства // *Журнал Сиб. фед. ун-та*. 2014. Сер. 2. Биология. № 7. С. 134–147.

**ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
РЕМОНТНОГО МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗНЫХ ДОЗ
ТКАНЕВОГО БИОСТИМУЛЯТОРА**

**NONSPECIFIC RESISTANCE INDICES OF REPLACEMENT YOUNG
CATTLE AGAINST THE BACKGROUND OF USING DIFFERENT DOSES
OF TISSUE BIO-STIMULANT**

И. А. Пушкарев

Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул

I. A. Pushkarev

Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul

E-mail: pushkarev.88-96@mail.ru

Аннотация

Научно-хозяйственный опыт проведен в 2020 г. на базе АО «Учхоз «Пригородное» Индустриального района г. Барнаула Алтайского края на ремонтном молодняке крупного рогатого скота. Нами по принципу аналогов было сформировано четыре подопытные группы ремонтных телочек по 10 голов в каждой. При подборе животных учитывались возраст (1 месяц) и живая масса (51,0 кг). Продолжительность опыта составляла 14 дней. Контрольным животным подкожно однократно вводили физиологический раствор в дозе 3,0 мл/гол., в I опытной группе тканевой биостимулятор в дозе 2,0 мл/гол., во II — 3,0 мл/гол., в III — 4,0 мл/гол. Опытную партию тканевого биостимулятора изготовили из субпродуктов и боенских отходов пантовых оленей по запатентованной технологии. По результатам опыта установлено, что наиболее оптимальной дозой применения тканевого биостимулятора следует считать 3 мл/гол., что способствует увеличению спонтанного НСТ-теста на 11,0 % ($p \leq 0,01$), стимулированного НСТ-теста на 7,1 % ($p \leq 0,05$) и повышению фагоцитарного индекса на 4,6 % ($p \leq 0,05$).

Abstract

The science-based economic experiment was conducted in 2020 on the farm of the AO “Uchkhos Prigorodnoye”, the Industrialniy District of the City of Barnaul, the Altai Region, on replacement young cattle. Four trial groups of 10 comparable replacement heifers were

formed. When selecting the animals, their age (1 month) and live weight (51.0 kg) were taken into account. The experiment lasted 14 days. In the control group, physiological salt solution was injected once subcutaneously in a dose of 3 mL per head; the tissue bio-stimulant was injected as following: in the 1st trial group — in a dose of 2 mL per head; in the 2nd trial group — 3 mL per head; in the 3rd trial group — 4 mL per head. The trial batch of tissue bio-stimulant was made of velvet antler deer by-products and slaughterhouse offal according to the patented technology. The research findings showed that the dose of 3 mL per head should be considered the most optimal dose of the tissue bio-stimulant administration; this contributed to an increase in spontaneous NBT test value by 11.0 % ($p \leq 0.01$), stimulated NBT test value by 7.1 % ($p \leq 0.05$), and increased *phagocytic activity of neutrophils* by 4.6 % ($p \leq 0.05$).

Введение

Основной целью при выращивании телят является достижение хорошей интенсивности роста и низкой заболеваемости. Высокая заболеваемость и смертность молодняка оказывает существенное влияние на экономическую эффективность ведения молочного скотоводства [1].

Заболеваемость телят во многом зависит от функциональной активности иммунной системы. Иммунная система молодняка крупного рогатого скота в начальный период постнатального онтогенеза недостаточно сформирована, что делает телят восприимчивыми к бактериальным и вирусным патогенам [2].

К факторам, оказывающим неблагоприятное влияние на иммунную систему телят, относят различного рода метаболические нарушения организма коров матерей на поздних сроках беременности [3–4], низкое содержание иммуноглобулинов в молозиве [5–6], погрешности в кормлении и содержании молодых животных [7]. Для поддержания естественных защитных сил организма телят, снижения частоты случаев заболеваний и увеличения интенсивности их роста в практике ведения молочного скотоводства применяют различные биологически активные кормовые добавки и препараты [8–9].

Одними из таких препаратов являются тканевые биостимуляторы. Применение тканевых биостимуляторов в практике ведения молочного скотоводства является большим дополнительным резервом для увеличения продуктивных показателей животных, повышения рентабельности отрасли животноводства. В настоящее время на основании экспериментальных исследований установлено, что под влиянием тканевых препаратов происходит повышение общей реактивности организма, функционального состояния ретикулоэндотелиальной системы, улучшение процессов пищеварения путем активации работы желудочных желез, стимулирование регенеративных процессов, газообмена, гликолиза, фосфорного обмена, гемопоэза уве-

личение показателей естественной резистентности и других жизненно важных функций организма животных [10]. При этом остаются недостаточно изучены вопросы, связанные с влиянием тканевых препаратов на становление неспецифической резистентности крови молодых животных.

В связи с этим целью наших исследований стало изучение уровня неспецифической резистентности крови ремонтного молодняка крупного рогатого скота на фоне применения разных доз тканевого биостимулятора.

Материал и методы исследования

Научно-хозяйственный опыт проведен в 2020 г. на базе АО «Учхоз «Пригородное» Индустриального района г. Барнаула Алтайского края на ремонтном молодняке крупного рогатого скота. Схема опыта представлена в табл. 1.

Согласно схеме опыта, представленной в табл. 1, нами сформировано четыре аналогичных группы ремонтных телочек по 10 голов в каждой. При подборе животных учитывались возраст (1 мес.) и живая масса (51,0 кг). Продолжительность опыта составляла 14 дней.

В ходе проведения опыта животные контрольной и опытных групп получали одинаковый рацион, сбалансированный по всем нормируемым элементам питания. Опытную партию тканевого биостимулятора изготовили из субпродуктов и боенских отходов пантовых оленей по запатентованной технологии. Материалом для приготовления тканевых препаратов служили селезенка, лимфоузлы, печень, матки с плодами (2–3 мес.), плацента, отобранные во время убоя здоровых животных. Полученный нативный материал помещали в холодильник на 6 суток при температуре +2 +4 °С. После чего весь материал в равных частях измельчали и помещали в поле ультразвука.

Таблица 1

Схема опыта

Группа	<i>n</i>	Наименование препарата	Возраст ремонтных телок при введении препарата, мес.	Доза подкожной инъекции препарата, мл / гол
Контрольная	10	Физиологический раствор	1	3,0
I опытная	10	Тканевой биостимулятор	1	2,0
II опытная	10	Тканевой биостимулятор	1	3,0
III опытная	10	Тканевой биостимулятор	1	4,0

Контроль качества на токсичность и реактогенность проводили на белых мышах, ГОСТ 31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности» и методические указания «По бактериологическому контролю стерильности ветеринарных биологических препаратов» № 115-6А от 03.06.1980.

Отбор проб крови для иммунологических исследований проводился дважды: перед началом введения препарата и на 14-й день после инъекции. Забор крови осуществляли из шейной вены в вакуумные пробирки (консервант литий гепарин).

Показатель спонтанного НСТ-теста определяли по количеству фагоцитов, поглотивших из раствора нитросиний тетразолий; стимулированный НСТ-тест — по количеству фагоцитов, инкубируемых со стимулятором (раствор зимозана), поглотивших из раствора нитро синий тетразолий; фагоцитарный индекс — путем подсчета количества фагоцитов, поглотивших латекс.

Данные, полученные в ходе опыта, подвергали биометрической обработке при помощи программного пакета Microsoft Excel 2016. Достоверность результатов опыта по отношению к контрольной группе рассчитывали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок, статистически значимыми считали различия при $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$. Достоверность результатов биохимических показателей крови на 14-й день после инъекции препарата в сравнении с началом опыта по t-критерию Стьюдента для зависимых выборок, статистически достоверными считали значения при (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

Результаты исследования и их обсуждения

Показатели неспецифической резистентности крови ремонтного молодняка крупного рогатого скота представлены в табл. 2.

Таблица 2

Показатели неспецифической резистентности крови ремонтного молодняка крупного рогатого скота

Показатель	Контроль	Группа		Шопытная
		Опытная	II опытная	
НСТ спон., у. ед.	<u>0,35 ± 0,013</u>	<u>0,32 ± 0,007</u>	<u>0,35 ± 0,006</u>	<u>0,36 ± 0,006</u>
	0,34 ± 0,009	0,35 ± 0,013 ^(**)	0,38 ± 0,005 ^{**(**)}	0,38 ± 0,014 [*]
НСТ стим., у. ед.	<u>0,54 ± 0,005</u>	<u>0,55 ± 0,009</u>	<u>0,51 ± 0,006</u>	<u>0,52 ± 0,005</u>
	0,56 ± 0,013	0,58 ± 0,009 ^(*)	0,60 ± 0,010 ^{*(***)}	0,59 ± 0,003 ^(***)
Фагоцитарный индекс, %	<u>51,0 ± 0,71</u>	<u>51,4 ± 1,33</u>	<u>52,3 ± 1,59</u>	<u>51,3 ± 2,33</u>
	51,4 ± 0,76	54,2 ± 0,75 [*]	56,0 ± 1,19 ^{*(***)}	57,0 ± 0,55 ^{***(*)}

Проведя анализ данных, представленных в табл. 2, можно заключить, что перед началом опыта значимых достоверных различий по исследуемым показателям между животными контрольной и опытных групп выявлено не было. После введения тканевого биостимулятора показатель спонтанного НСТ-теста, отражающего метаболический потенциал клеток, способных к фагоцитозу, в крови телочек I, II и III опытных групп увеличился на 2,9–11,7 % ($p \leq 0,01$). В сравнении с началом опыта рассматриваемый показатель в крови животных контрольной группы уменьшился на 2,9 %, в опытных группах он стал больше на 5,5–9,3 % ($p \leq 0,01$).

Самый высокий показатель стимулированного НСТ-теста, позволяющий оценить состояние кислородзависимого механизма бактерицидной активности фагоцитов, на 14 день после инъекции препарата отмечался у ремонтного молодняка II опытной группы, что на 7,1 % ($p \leq 0,05$) больше, чем в контроле. У молодняка I и II опытных групп — 3,5 и 5,3 %. При сопоставлении значений стимулированного НСТ-теста с началом опыта выявлено увеличение данного показателя в контроле на 3,7 %, в опытных группах рассматриваемое значение возросло на 5,4–17,6 % ($p \leq 0,001$).

Фагоцитарный индекс нейтрофилов, отражающий поглотительную способность фагоцитов, в крови ремонтного молодняка I, II и III опытных групп стал больше на 2,8 % ($p \leq 0,05$), 4,6 % ($p \leq 0,05$), 5,6 % ($p \leq 0,001$) соответственно в сравнении с аналогичным показателем в контроле. В сравнении с предыдущими значениями фагоцитарный индекс у телочек в контроле остался практически на том же уровне, с минимальным расхождением в 0,4 %. В опытных группах рассматриваемое значение увеличилось на 2,8–5,7 % ($p \leq 0,05$).

Полученные в нашем опыте результаты согласуются с исследованиями других авторов, изучавших влияние тканевых препаратов «Гамавит» и «БиоТЭК» на иммунную систему молодняка крупного рогатого скота [11–12].

Имеются две основные гипотезы, объясняющие влияние тканевых препаратов на иммунную систему животных. Обе гипотезы не противоречат друг другу и взаимно дополняют одна другую. Первая гипотеза более консервативна и утверждает, что иммунная система животных дает реакцию на внедрения чужеродного белка, мобилизуя защитные силы организма [13]. Вторая свидетельствует о том, что, согласно учению академика В. П. Филатова, в тканях животных, сохраняемых в условиях неблагоприятных для их существования, накапливаются особые вещества, называемые «биогенными стимуляторами». Из этих тканей выделены органические кислоты с большим молекулярным весом. Животные ткани, находящиеся в препарате, при парентеральном введении медленно

распадаются с образованием большого количества умеренных раздражителей, которые действуют на ферменты. С одними они вступают в химическую связь, присоединяясь к молекулам белка фермента, по отношению к другим являются катализаторами. А так как нервная ткань, как полагал академик В. П. Филатов, содержит необходимые высокоактивные ферментные системы, являющиеся наиболее чувствительными, то они первые испытывают влияние биогенных стимуляторов, чем и обеспечивается руководящая роль нервной системы и коры мозга при применении тканевых препаратов. Под влиянием биогенных веществ повышается тонус центральной нервной системы и вегетативной иннервации, улучшается их регулирующие влияние на органы и ткани, в том числе и на органы иммунной системы [10].

Нервная и иммунная системы организма животных тесно связаны между собой. Доказано, что нервная система иннервирует центральные и периферические иммунокомпетентные органы. Вырабатываемые нервной системой биологически активные вещества способны оказывать влияние на функциональное состояние иммунной системы. Ключевым звеном аппарата нервной регуляции иммунитета является гипоталамус. Гипоталамус дает начало сложному эфферентному пути передачи центральных нейрорегуляторных влияний на иммунокомпетентные клетки, которые обладают соответствующими рецепторами к факторам нервной регуляции [14].

Таким образом, введение тканевого биостимулятора ремонтному молодняку крупного рогатого скота в возрасте одного месяца в разных дозах способствует увеличению неспецифической резистентности организма. Наиболее оптимальной дозой применения тканевого биостимулятора следует считать 3 мл/гол., что способствует увеличению спонтанного НСТ-теста на 11 % ($p \leq 0,01$), стимулированного НСТ-теста на 7,1 % ($p \leq 0,05$) и повышению фагоцитарного индекса на 4,6 % ($p \leq 0,05$).

Литература

1. Garcia M. et al. Increasing intake of essential fatty acids from milk replacer benefits performance, immune responses, and health of preweaned Holstein calves // Journal of Dairy Science. 2015. Vol. 1. P.458–477.
2. Langel S. N. et al. Effect of feeding whole compared with cell-free colostrum on calf immune status: The neonatal period // Journal of Dairy Science. 2015. Vol. 98. P. 3729–3740.
3. Ling T. et al. Maternal late-gestation metabolic stress is associated with changes in immune and metabolic responses of dairy calves // Journal of Dairy Science. 2018. Vol. 101. P. 6568–6580.

4. Gerbert C. et al. Effects of ad libitum milk replacer feeding and butyrate supplementation on behavior, immune status, and health of Holstein calves in the postnatal period // *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101. P. 7348–7360.

5. Lora I. et al. Factors associated with passive immunity transfer in dairy calves: combined effect of delivery time, amount and quality of the first colostrum meal // *Animal*. 2018. Vol. 12. P. 1041–1049.

6. McGee M. et al. Review: passive immunity in beef-suckler calves // *Animal*. 2019. Vol. 13. P. 810–825.

7. Jacometo C. B. et al. Maternal supply of methionine during late pregnancy is associated with changes in immune function and abundance of micro RNA and mRNA in Holstein calf polymorphonuclear leukocytes // *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101. P. 8146–8158.

8. Hussain D. A. et al. Effect of probiotic and synbiotic on faecal microbial count and cell-mediated immunity in crossbred calves // *Indian Journal of Animal Research*. 2018. Vol. 52. P. 1452–1456.

9. Зинченко Д. А. Влияние тканевых биостимуляторов на организм животных // *Международ. журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014. № 3. С. 124–125.

10. Рубинский И. А., Петрова О. Г. Иммуные стимуляторы в ветеринарии Ульяновск : УГСХА, 2011. 168 с.

11. Топурия Г. М., Топурия Л. Ю. Иммуный статус крупного рогатого скота при применении Гамавита // *Извест. Оренбург. гос. аграр. ун-та*. 2011. № 1. С. 69–71.

12. Блохин П. И. Влияние препарата «Био-ТЭК» на биохимические показатели крови коров и полученных от них телят // *Труды КубГАУ*. 2011. №73(09). С. 2–9.

13. Даричева Е. Н., Ермолаев В. А. Тканевая терапия в ветеринарной медицине. Ульяновск : УГСХА, 2011. 168 с.

14. Созаева Д. И., Бережанская С. Б. Основные механизмы взаимодействия нервной и иммунной систем. Клинико-экспериментальные данные // *Кубанский науч. мед. вестн.* 2014. № 3. С. 145–150.

**ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NRF2 К МОДУЛЬНОМУ
НАНОТРАНСПОРТЕРУ ПОСРЕДСТВОМ ЛЕЙЦИНОВОЙ МОЛНИИ***

POSTTRANSLATIONAL ATTACHMENT OF THE NRF2 TRANSCRIPTION
FACTOR TO A MODULAR NANOTRANSPORTER VIA LEUCINE ZIPPER

A. С. Сабуров¹, Т. Н. Лупанова², А. В. Уласов²

¹*Первый Московский государственный медицинский университет
им. И. М. Сеченова*

²*Институт биологии гена РАН, Москва*

A. S. Saburov¹, T. N. Lupanova², A. V. Ulasov²

¹*I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*

²*Institute of Gene Biology RAS, Moscow*

E-mail: saburovwh@gmail.com

Аннотация

Показана возможность посттрансляционного присоединения транскрипционного фактора Nrf2 к модульному нанотранспортеру (МНТ) при помощи белкового мотива лейциновой молнии с высокой аффинностью.

Abstract

The possibility of post-translational attachment of transcription factor Nrf2 to modular nanotransporter (MNT) via leucine zipper motif with high affinity was shown.

Транскрипционный фактор человека Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) является частью сигнального пути Nrf2/ARE, который, координируя целый спектр цитозащитных генов, обеспечивает сохранение гомеостаза при окислительном стрессе. Регулируемые Nrf2 ARE-элементы (Antioxidant Response Elements) контролируют глутатионовые и тиоредоксиназные антиоксидантные системы, ферменты детоксикации, гены ме-

© А. С. Сабуров, Т. Н. Лупанова, А. В. Уласов, 2020

* Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 17-14-01304).

таболизма липидов, углеводов и гема. Вызывает интерес вовлеченность Nrf2 в патогенез множества заболеваний, связанных с окислительным стрессом: нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний, рака и диабета. Применение низкомолекулярных индукторов Nrf2 на различных клеточных и животных моделях давало значительный терапевтический эффект. С другой стороны, эти соединения отличаются неспецифичностью действия.

Доставка полноразмерного Nrf2 в клетки-мишени лишена этого недостатка и может служить альтернативным подходом. Для этой цели мы планируем использовать МНТ, рекомбинантные белковые структуры, которые доказали свою эффективность при доставке низкомолекулярных соединений и регуляторных белков в клетки [1]. Поскольку ограничения бактериального синтеза затрудняют наработку белка более 100 кДа, возникает задача посттрансляционного соединения рекомбинантных Nrf2 и МНТ, нарабатанных в *E. coli*. Для этого мы использовали высокоаффинный белковый мотив лейциновой молнии.

В рамках настоящей работы на N-конец Nrf2 и C-конец МНТ были клонированы фрагменты лейциновой молнии Ze/Zr [2]. Штамм *E. coli* BL21(DE3) использовался для наработки обоих белков. Выделение МНТ проводилось из растворимой фракции при помощи Ni-NTA аффинной хроматографии. Nrf2 выделялся из телец включения лизированной биомассы клеток солибилизирующим буфером с 8M Urea и 100 μ M DTT, а затем диализовался в PBS с 100 μ M DTT. Комплекс МНТ с Nrf2 формировался при 4 °C и различных молярных соотношениях (1:1, 2:1 и 4:1) в течение 18–21 часа. Образованный комплекс МНТ-Nrf2 был очищен с помощью Ni-NTA аффинной хроматографии. Образование комплекса подтверждалось иммуноблоттингом с антителами на Nrf2 и МНТ.

Проведенная работа показывает принципиальную возможность посттрансляционного объединения крупных белков при помощи высокоаффинной лейциновой молнии Ze/Zr.

Литература

1. Rosenkranz A. A. et al. Delivery systems exploiting natural cell transport processes of macromolecules for intracellular targeting of Auger electron emitters // *Nuclear Medicine and Biology*. 2019.
2. Moll J. R. et al. Designed heterodimerizing leucine zippers with a range of pIs and stabilities up to 10–15 M // *Protein Science*. 2001. Т. 10, №. 3. P. 649–655.

**ЭФФЕКТУСЛОВИЙКУЛЬТИВИРОВАНИЯИДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
IN VITRO КУЛЬТУР НА СООТНОШЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФЛАВОНОВ
SCUTELLARIA BAICALENSIS**

**EFFECT OF CULTURE CONDITIONS AND DIFFERENTIATION
OF IN VITRO CULTURES ON THE RATIO OF MAIN FLAVONES
OF SCUTELLARIA BAICALENSIS**

С. А. Саламайкина ^{1,2}, А. И. Соловьёва ², А. Ю. Степанова ²

¹Московский физико-технический институт

²Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

S. A. Salamaikina ^{1,2}, A. I. Solov'eva ², A. Yu. Stepanova ²

¹MIPT

²Timiryazev Institute of Plant Physiology RAN, Moscow

E-mail: salamaikina.sa@phystech.edu

Аннотация

Исследовали влияние условий культивирования и дифференциации на соотношение пар основных флавонов — байкалин-байкалеин (BG-B) и вогонозид-вогонин (WG-W) в *in vitro* культурах *Scutellaria baicalensis* в течение цикла культивирования. У недифференцированных культур преобладал синтез пары BG-B. В культуре hairy roots при выращивании на жидкой или агаризованной средах доминировали разные флавоны. В первом случае — флавоны, имеющие метильную группу, — WG-W, а во втором — BG-B.

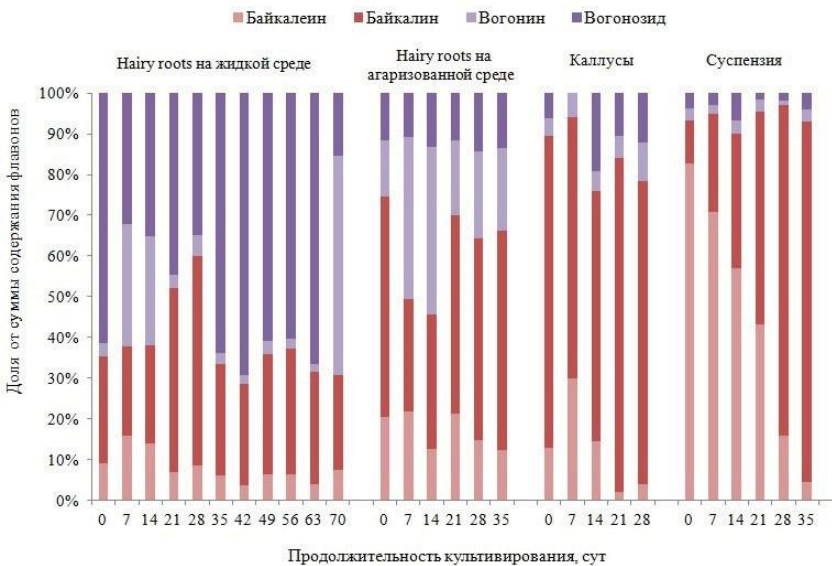
Abstract

The study of the influence of culture conditions and differentiation on the ratio of pairs of the main flavones, baicalin-baicalein (BG-B) and wogonoside-wogonin (WG-W) in in-vitro cultures of *Scutellaria baicalensis* was carried out. In undifferentiated cultures, synthesis of the BG-B pair prevailed. In hairy roots culture grown on liquid or solid media, different flavones dominated. In the first case, flavones with a methyl group, WG-W, dominated, and in the second, BG-B.

Scutellaria baicalensis Georgi — многолетнее лекарственное растение, синтезирующее широкий спектр биологически активных веществ фенольной

природы, большинство из которых синтезируется в подземной части. Основными корнеспецифическими флавонами являются байкалеин (5,6,7-тригидроксифлавоны, В), вогонин (5,7-дигидрокси-8-метоксифлавоны, W) и их гликозилированные формы: байкалин (байкалеин 7-О-β-D-глюкуронид, ВG) и вогонозид (вогонин 7-О-β-D-глюкуронид, WG). Различия в положении гидроксильных групп и наличии метильного радикала в составе данных флавонов определяют их различия в фармакологических свойствах. Так ВG и В проявили мощную противовирусную активность в системе *in vitro*, что дает возможность для разработки критически необходимых противокоронавирусных препаратов. В свою очередь, W способен подавлять рост опухолевых клеток, не повреждая нормальные диплоидные клетки.

Проблему получения растительного сырья в достаточном количестве можно решить с помощью использования культивирования растительного материала в условиях *in vitro*. Поскольку синтез ценных флавонов происходит в корнях *S. baicalensis*, целесообразно использовать культуру корней (hairy roots) или полученные из них недифференцированные ткани — суспензионную или каллусную культуры.



Доля содержания ВG, В, WG и W от суммы флавонов в *in vitro* культурах *S. baicalensis* в течение цикла культивирования

В своей работе мы исследовали влияние условий культивирования и дифференциации на соотношение пар флавонов BG-B и WG-W в *in vitro* культурах *S. baicalensis* в течение цикла культивирования.

Объектами исследования был штамм hairy roots *S. baicalensis*, культивируемый на агаризованной и жидкой питательных средах, и полученные из них каллусная и суспензионная культуры.

С помощью HPLC было установлено, что у недифференцированных культур на протяжении всего цикла культивирования преобладал синтез пары BG-B (в каллусах — 91,0–98,2 %, в суспензии — 75,8–93,8 %) (см. рисунок). Главной отличительной чертой культуры hairy roots при выращивании на жидкой среде было самое высокое содержание глюкоронида — WG, которое падало только в течение первых 7 сут. культивирования и в фазе деградации, а суммарное содержание пары WG-W доходило до 70 % от содержания четырех основных флавонов. При культивировании бородач корней на агаризованной среде содержание данной пары флавонов значительно сокращалось и варьировало от 25 до 55 %. Отмеченные различия в дифференцированных и недифференцированных тканях могут быть обусловлены различной активностью флавонов 6-гидроксилазы, флавонов 8-гидроксилазы и 8-О-метилтрансферазы, ответственных за образование корнеспецифических флавонов из хризина. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

КОБЫЛЬЕ МОЛОКО В РАЗРАБОТКЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ

MARE'S MILK IN THE DEVELOPMENT OF SPORTS NUTRITION PRODUCTS

Х. С. Сарсембаев^{1,2}, Ю. А. Синявский²

¹Алматинский технологический университет, Республика Казахстан

²Казахская академия питания, Алматы, Республика Казахстан

Kh. S. Sarsembayev^{1,2}, Y. A. Synyavskiy²

¹Almaty Technological University, Kazakhstan

²Kazakh Academy of Nutrition, Almaty, Kazakhstan

E-mail: husein.a14@gmail.com

Аннотация

Вопрос быстрого восстановления спортсменов после тяжелых тренировок и соревнований является актуальным и требует поиска эффективных приемов и средств адаптивного характера. Использование кобыльего молока при создании спортивного питания является новым и перспективным направлением, связанным не только с уникальностью химического состава молока, но и его высокими иммунобиологическими характеристиками.

Abstract

The question of rapid recovery of athletes after hard training and competition is urgent and requires the search for effective techniques and means of an adaptive nature. The use of mare's milk in the creation of sports nutrition is a new and promising direction associated not only with the uniqueness of the chemical composition of milk, but also with its high immunobiological characteristics.

На современном этапе в спорте пристальное внимание уделяется спортивному питанию, так как работоспособность спортсмена во многом зависит и повышается за счет хорошо подобранной стратегии питания [1, 2].

Совершенствование методов тренировки в разных видах спорта ведет к значительному увеличению затрат энергии, которое, в свою очередь, тре-

бует соответственного увеличения калорийности рациона питания спортсменов. Потребление нутриентов у спортсменов должно быть выше рекомендуемой суточной нормы для человека, не испытывающего повышенных физических нагрузок [1, 3]. Одной из распространенных стратегий для оптимизации периода восстановления является использование специализированного спортивного питания, которое помогает значительно быстрее восстановиться после тренировок и соревнований [1, 4]. Следует отметить, что при конструировании специализированных продуктов спортивного питания в большинстве используется соевый белок, сывороточные белки молока и сухое коровье молоко.

Целью настоящего исследования является разработка спортивного питания на основе сухого кобыльего молока. Характеризуя кобылье молоко как один из ведущих ингредиентов спортивного питания, следует отметить, что в кобыльем молоке содержится около 40 биологически активных ингредиентов, включая низкомолекулярные пептиды, свободные аминокислоты, лактоальбумины и глобулины, витамины А, С, В1, В2, В6, В12, лизоцим, макро- и микроэлементы. Молоко характеризуется высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и наличием линоленовой кислоты семейства омега-3 [5].

Кобылье молоко, содержит лизоцим, обладающий антимикробным действием, уровень которого в 4–5 раз выше, чем в коровьем молоке [6]. Особенностью кобыльего молока является отсутствие в его составе трансжирных кислот, вызывающих атеросклероз, болезни системы кровообращения и способствующих онкозаболеваниям [7,8]. Все это свидетельствует о его пищевой безопасности и высокой биологической ценности при использовании как в нативном, так и в переработанном виде.

Главные преимущества кобыльего молока заключаются в том, что более половины белковой фракции кобыльего молока представлены альбуминами и глобулинами, которые хорошо перевариваются и усваиваются, не вызывая нарушений со стороны желудочно-кишечного тракта и печени. Кроме того, кобылье молоко содержит высокий уровень лактоферрина, более низкое содержание α -казеина в сравнении с коровьим молоком, что определяет его гипоаллергенные свойства по сравнению с коровьим молоком [11].

Отсутствие жесткой термической обработки кобыльего молока позволяет сохранять в нем все ферменты, витамины и биологически активные вещества в нативном виде [9, 10].

Жир кобыльего молока, содержащий полиненасыщенные жирные кислоты, уровень которых почти в 10 раз выше, чем в коровьем, легко усваивается организмом.

Кроме того, кобылье молоко значительно превосходит коровье по содержанию аскорбиновой кислоты, витаминов группы В, а также по макро- и микроэлементному составу.

Для создания продуктов спортивного питания целесообразно использовать основные и вспомогательные ингредиенты в сухом виде, в связи с чем нами в качестве базовой основы было использовано сухое кобылье молоко и все ингредиенты в сухом виде. Учитывая химический состав и физиолого-биохимические характеристики сухого кобыльего молока, нами была разработана рецептура смеси для спортивного питания на основе сухого кобыльего 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. В 100 г сухого кобыльего молока содержится 17,5–17,7 г белка, 15,0–15,5 г жира, 60,0–65,1 г углеводов, пищевая ценность сухого кобыльего молока — в промежутке от 415 до 470 ккал.

Для приготовления продукта используют сухое кобылье молоко, сухое обезжиренное коровье молоко, сухие сливки, витамины, минеральные вещества, сухие плоды облепихи, пектин цитрусовый, инулин, гинестеин, сухие штаммы молочнокислых- и бифидобактерий, фукоидан.

В продукте содержится около 20,73 г белка; 15,0 г жиров; 58,0 г углеводов; калорийность продукта составляет в среднем 450 ккал/100 г.

Жирнокислотный состав специализированного продукта на 20,9 % представлен мононенасыщенными жирными кислотами, на 23,0 % — полиненасыщенными и на 56,0 % — насыщенными жирными кислотами. Содержание ω -3 и ω -6 жирных кислот в специализированном продукте равняется 66,17 мг% и 70,95 мг% соответственно, отсутствуют трансизомеры жирных кислот.

Ниже приведен состав сухой смеси для спортивного питания на 100 г:

Сухое молоко кобылье — 55,0

Сухие сливки — 30,0

Сухая бактериальная закваска, включающая сухие штаммы лакто- и бифидобактерий — 0,4

Сухое обезжиренное коровье молоко — 13,0

Сухие зародыши пшеницы — 1

Сухие плоды облепихи — 0,5
Инулин — 0,2
Пектин цитрусовый — 1
Генистеин — 0,02–0,022
Витаминный премикс — 0,192–0,256
Бета-каротин (Веторон Е) 2 % — 0,020–0,025
Минеральный премикс — 0,176–0,237
Фукоидан — 0,15 мг

Калорийность сухого продукта спортивного питания составляет около 450 ккал на 100 г продукта. При суточном употреблении 100 г сухого продукта, растворенного в 1 л воды или молока, спортсмен будет потреблять более 450 ккал энергии, необходимой для выполнения физической нагрузки.

Исходя из приведенных данных, можно говорить о том, что кобылье молоко, имея уникальный состав и высокую биологическую ценность, может быть использовано в качестве основы при производстве продуктов спортивного питания, направленных на восстановление организма после повышенных физических нагрузок в период тренировок, в соревновательный и постсоревновательный периоды с целью восполнения потребности в основных биологически активных ингредиентах и повышения физиолого-биохимического статуса спортсменов.

Литература

1. Лавриненко С. В., Выборная К. В., Кобелькова И. В. и др. Использование специализированных продуктов для питания спортсменов в подготовительном периоде спортивного цикла // Вопросы питания. 2017. Т. 86, № 4.
2. Erdman A., Travis D. T., Burke M. Nutrition and Athletic Performance: Position of Dietitians of Canada, the Academy of Nutrition and Dietetics and the American College of Sports Medicine. 2016. 46 p. URL: <https://www.dietitians.ca/downloads/public/naop-position-paper.aspx>.
3. Hull M. V., Jagim A. R., Oliver J. M. et al. Gender differences and access to a sports dietitian influence dietary habits of collegiate athletes // J. Int. Soc. Sports Nutr. 2016. Vol. 13. P. 38.
4. Shirato M., Tsuchiya Y., Sato T. et al. Effects of combined β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) and whey protein ingestion on symptoms of eccentric exercise-induced muscle damage // J. Int. Soc. Sports Nutr. 2016. Vol. 13. P. 7.
5. Кисилевич Е. Э. Сухое кобылье молоко для детского питания : мат-лы IV Междунар. студ. науч. конф. «Студенческий научный форум». 2012. С. 56–58.
6. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок. Руководство Р4.1.1672-03. URL: <http://base.garant.ru/4182073>.

-
7. СТ РК ИСО 12081-2010. Молоко и молочные продукты. Определение содержания кальция. Титриметрический метод. URL: http://online.zakon.kz/Document/doc_id=37658323.
 8. Скурихин И. М. Химический состав пищевых продуктов. М. : Легкая и пищевая промышленность, 1984. 358 с.
 9. Попова Н. В. Инновация в технологии восстановления сухого молока как фактора управления качеством восстановленных продуктов переработки молока // Управление качеством товаров и услуг. 2013. Т. 7, № 4. С. 161–186.
 10. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок. Руководство Р4.1.1672-03. URL: <http://base.garant.ru/4182073>.
 11. Codex alimentarius. Жиры масла производные продукты. М. : Весь мир, 2007. 65 с.

**КОНЬЮГАТ РЕКОМБИНАНТНОГО ТРЕТЬЕГО ДОМЕНА
АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ
ПЛГА С ПАКЛИТАКСЕЛОМ: ФАРМАКОКИНЕТИКА
И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ**

**PACLITAXEL LOADED PLGA NANOPARTICLES CONJUGATED
WITH α -FETOPROTEIN THIRD DOMAIN: PHARMACOKINETICS
AND ANTITUMOR EFFICACY**

М. Б. Сокол, Н. Г. Яббаров,
М. Р. Молляева, М. В. Фомичёва, Е. Д. Никольская

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

M. B. Sokol, N. G. Yabbarov, M. R. Mollaeva, M. V. Fomicheva, E. D. Nikolskaya

IBCF RAS, Moscow

E-mail: mariyabsokol@gmail.com

Аннотация

Паклитаксел (Ptx) обладает противоопухолевой активностью в отношении ряда злокачественных новообразований. Инкапсулирование гидрофобного Ptx в наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) позволяет увеличить его биодоступность и обеспечивает пролонгированное высвобождение Ptx. Конъюгаты частиц ПЛГА с векторной молекулой способствуют селективному накоплению препарата в тканях-мишенях. Был разработан метод получения конъюгата частиц ПЛГА, содержащих Ptx, с рекомбинантным третьим доменом альфа-фетопротеина (rAFP3d-NP), который известен как специфичный онкомаркер. Целью работы являлось изучение фармакокинетики и противоопухолевой активности rAFP3d-NP.

Abstract

Paclitaxel (Ptx) shows antitumor activity against a number of malignant neoplasms. Encapsulation of hydrophobic Ptx in nanoparticles (NPs) based on a copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA) increase Ptx bioavailability and provides its prolonged release. Conjugates of NPs with a vector molecule promote selective accumulation of the drug in target tissues. We developed a conjugate of Ptx-loaded NPs with a recombinant third domain of alpha-fetoprotein (rAFP3d-NP), the latter being a specific tumor marker. The aim of this work was to study the pharmacokinetics and antitumor activity of rAFP3d-NP.

Methods

Pharmacokinetics and biodistribution: 120 female Wistar rats, IV route, 3 groups, dose equivalent to Ptx 6 mg/kg. Antitumor efficacy: 30 female BALB/c mice, 4T1 cell line (1×10^6) injected subcutaneously, 4 groups, dose equivalent to Ptx 0.46 mg/kg, IV route, once every 5 days.

Results

All the pharmacokinetic profiles showed the typical biphasic pattern characterizing a rapid distribution phase, followed by an elimination phase (Fig. 1). Free Ptx revealed a rapid achievement of the maximum concentration being detectable in serum only up to 8 h. The detection period of NPs and rAFP3d-NP was 12 h after administration.

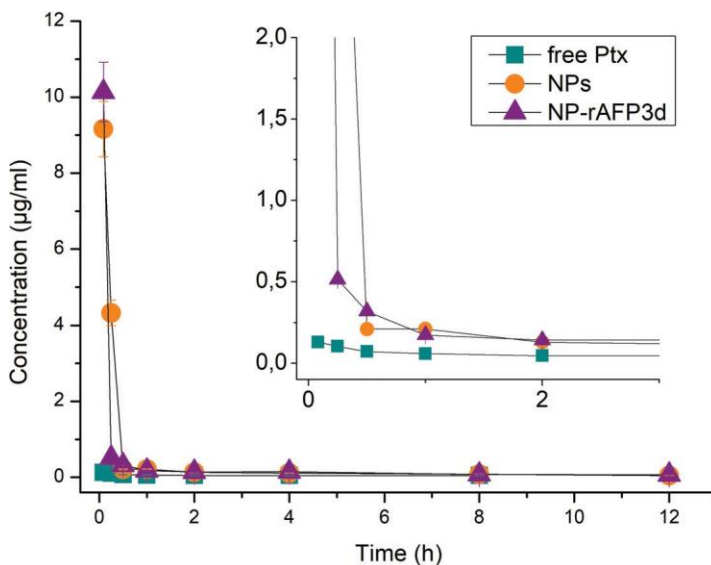


Fig. 1. Pharmacokinetics profile of free Ptx, NPs and rAFP3d-NP (mean \pm SD, $n = 6$)

Compared to free Ptx, treatment with both types of polymeric formulations resulted in a decrease in drug clearance rate (Cl) from serum (Table). The level of serum exposure of paclitaxel (AUC) was increased in case of NPs and rAFP3d-NP compared to that obtained from free drug ($p < 0,05$).

**Plasma pharmacokinetic parameters of free Ptx,
NPs and rAFP3d-NP (mean \pm SD, $n = 6$)**

Parameters	Formulations			Units
	Free Ptx	NPs	rAFP3d-NP	
AUC(0 \rightarrow ∞)	0,98 \pm 0,09	4,24 \pm 0,35	5,29 \pm 0,36	(μ g/mL)*(h)
CL	6,13 \pm 0,47	1,41 \pm 0,12*	1,13 \pm 0,07*	(mg/kg)/(μ g/ml)/h
Vd	67,47 \pm 4,53	13,84 \pm 1,24*	12,38 \pm 0,79*	L/kg
t1/2	7,63 \pm 0,56	6,78 \pm 0,51	7,57 \pm 0,52	h
Cmax	0,13 \pm 0,01	9,16 \pm 0,64	10,14 \pm 0,60	μ g/mL
Tmax	0,083	0,083	0,083	h

* $p < 0,05$.

All the formulations underwent a wide distribution to examined tissues (Fig. 2). The highest deposition was in the spleen, followed by the liver. NPs and NP-rAFP3d less accumulated in the kidneys and heart than free Ptx, minimizing systemic side effects.

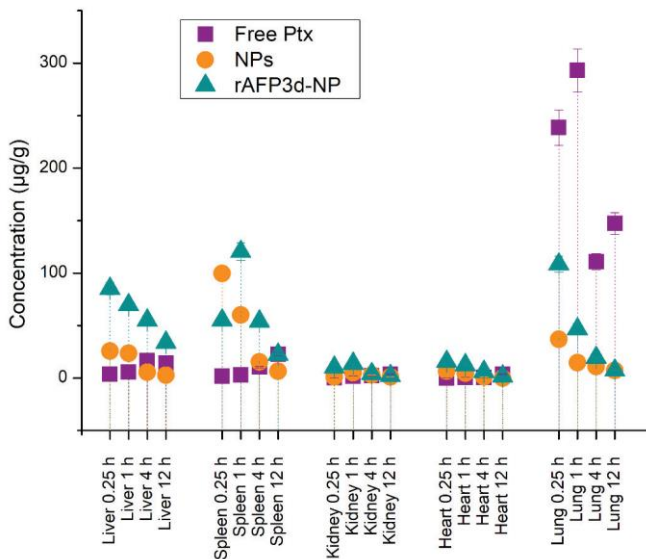


Fig. 2. Tissue distribution of free Ptx, NPs and rAFP3d-NP (mean \pm SD, $n = 6$)

The tumor growth rate in mice treated with rAFP3d-NP was significantly lower than that in the groups treated with free Ptx and NPs (Fig. 3). After the third injection of rAFP3d-NP on day 11, we observed a decrease in tumor volume.

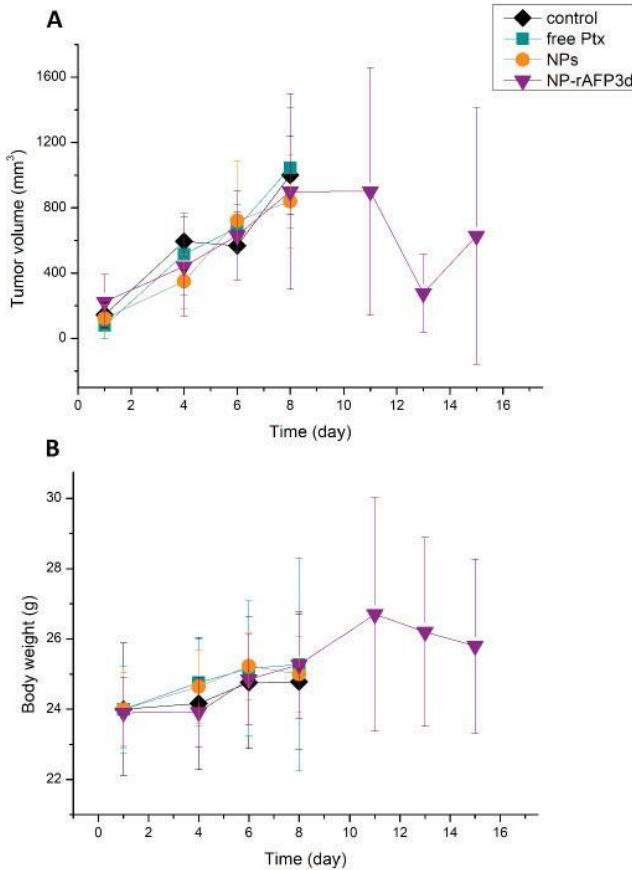


Fig. 3. (A) Tumor growth inhibition and (B) body weight changes after IV treatment of free Ptx, NPs and rAFP3d-NP in mice (mean \pm SD, $n = 7$)

The results obtained indicate a prolonged release of Ptx from NPs and rAFP3d-NP and confirm the effectiveness of targeted drug delivery to the tumor using the vector molecule.

**ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ
БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ НА ПОВЕРХНОСТИ
САМООЧИЩАЮЩИХСЯ ТКАНЕВЫХ МАТЕРИАЛОВ ***

PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF BACTERIA AND VIRUSES
ON THE SURFACE OF SELF-CLEANING TEXTILE MATERIALS

М. И. Соловьёва^{1,2}, Д. С. Селищев^{1,2}, Г. А. Степанов^{1,3}, Е. С. Журавлёв³,
М. В. Сергеева⁴, А. Б. Комиссаров⁴, В. В. Морозова³, А. В. Бардашева³,
Ю. Н. Козлова³, В. А. Рихтер³, Д. В. Козлов^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН, Новосибирск

³Институт химической биологии

и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

⁴НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург

M. I. Solovyeva^{1,2}, D. S. Selishchev^{1,2}, G. A. Stepanov^{1,3},
E. S. Zhuravlev³, M. V. Sergeeva⁴, A. B. Komissarov⁴, V. V. Morozova³,
A. V. Bardasheva³, Y. N. Kozlova³, V. A. Richter³, D. V. Kozlov^{1,2}

¹Novosibirsk State University

²BIC SB RAS, Novosibirsk

³ICBFM SB RAS, Novosibirsk

⁴Smorodintsev Research Institute of Influenza MoH, St. Petersburg

E-mail: smi@catalysis.ru

Аннотация

Специализированные ткани на основе природных и синтетических волокон, содержащие в своем составе фотокаталитически активный модификатор, способные под действием света очищать собственную поверхность от химических и биологических загрязнителей. На примере бактерий *E. coli* и *S. aureus*, бактериофага PA136 и вируса гриппа А показано, что под действием света происходит инактивация

© М. И. Соловьёва, Д. С. Селищев, Г. А. Степанов, Е. С. Журавлёв, М. В. Сергеева, А. Б. Комиссаров, В. В. Морозова, А. В. Бардашева, Ю. Н. Козлова, В. А. Рихтер, Д. В. Козлов, 2020

* Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ №18-29-17055 и гранта Президента РФ № 075-15-2019-1086 (МК-3483.2019.3).

ция биологических объектов на поверхности модифицированных тканей. Для вируса гриппа с использованием метода ОТ-ПЦР показано, что помимо инактивации при длительном освещении происходит разрушение вирусных частиц и деструкция генетического материала до низкомолекулярных соединений.

Abstract

Special fabrics based on natural and synthetic fibers, which contain photoactive modifier, are able to clean under irradiation their surface. According to experiments with *E. coli* and *S. aureus* bacteria, PA136 bacteriophage, and influenza A virus, inactivation of biological objects occurs on the surface of material under irradiation. It is shown using the RT-PCR method that under long-term irradiation the degradation of virus particles and destruction of genetic material to low-molecular compounds follows the inactivation.

Благодаря свойствам воздухопроницаемости, влагопоглощения, мягкости и гибкости хлопкосодержащие ткани широко используются в текстильной промышленности, но они также являются благоприятным субстратом для стабилизации и переноса микроорганизмов. Для придания свойств самоочистки и обеспечения быстрой гибели микроорганизмов на поверхности ткани был разработан способ модификации хлопковых и хлопкополиэфирных тканей фотоактивным компонентом на основе нанокристаллического диоксида титана. Разработанные материалы способны под действием света (УФ-А и синяя область спектра) полностью окислять низкомолекулярные соединения (спирты, кетоны, ароматические и гетеро-соединения) до углекислого газа и воды, а также обеспечивать окислительную деструкцию супрамолекулярных соединений и бактерий.

Изучение антибактериальной активности материалов проводили с использованием бактерий *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923. Для обоих объектов наблюдалось существенное увеличение скорости гибели на поверхности материала по сравнению с исходной тканью за счет образования высоко реакционноспособных частиц. В случае вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) его инфекционность, которую определяли методом TCID₅₀, полностью пропадала за 20 минут освещения, в то время как для исходной ткани она детектировалась в течение часа. С использованием метода ОТ-ПЦР показано, что дальнейшее освещение фототкани приводит к деструкции генетического материала вируса и снижению количества вирусной РНК в анализируемых пробах вплоть до следовых количеств, что подтверждает механизм действия таких материалов.

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО
СТАБИЛЬНУЮ ПРОДУКЦИЮ ФОСФОЛИПАЗЫ
С *BACILLUS THURINGIENSIS* В *BACILLUS SUBTILIS* ***

**CONSTRUCTION OF A VECTOR THAT PROVIDES STABLE
PHOSPHOLIPASE PRODUCTION WITH *BACILLUS THURINGIENSIS*
IN *BACILLUS SUBTILIS***

К. В. Старожилова¹, Ю. А. Меркульева², Д. Н. Щербаков^{1,2}

¹ *Алтайский государственный университет, Барнаул*

² *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

K. V. Starozhilova¹, Yu. A. Merkul'eva², D. N. Shcherbakov^{1,2}

¹ *Altai State University, Barnaul*

² *State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

E-mail: ksenka0611@mail.ru

Аннотация

Для повышения уровня синтеза белка в работе был сконструирован вектор, обеспечивающий стабильную продукцию фосфолипазы с *Bacillus thuringiensis* в *Bacillus subtilis*.

Abstract

In order to increase the level of protein synthesis, a vector was constructed to provide stable phospholipase production from *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus subtilis*.

Фосфолипаза С — фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз фосфолипидов на диацилглицериды и полярные фосфатсодержащие группы. В связи с широким использованием в технологических процессах очистки и рафинирования растительных масел в последнее время к этой группе ферментов привлечено особое внимание, в частности, в пищевой отрасли и в сфере производства биодизеля. Так как процессы переработки масел ча-

© К. В. Старожилова, Ю. А. Меркульева, Д. Н. Щербаков, 2020

* Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, номер темы FZMW-2020-0002, «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия».

сто сопряжены с высокими температурами, особый интерес представляют термостабильные ферменты, источником которых выступают представители семейства *Bacillus*. Использование в качестве продуцентов природных штаммов бактерий не всегда позволяет получать достаточные количества целевых белков. Методы мутагенеза и селекции частично решают эту проблему, однако даже в этом случае уровень синтеза оказывается недостаточным для достижения рентабельности. Решить проблему выхода белка могут методы генной инженерии, с использованием которых удастся конструировать продуценты, обеспечивающие необходимый уровень синтеза белков.

Ранее нами были определены нуклеотидные последовательности, кодирующие фосфолипазу С ряда штаммов *Bacillus thuringiensis*. Был выбран перспективный вариант для анализа биохимических свойств, его последовательность была встроена в экспрессионный вектор рНТ255 [1]. Однако уровень синтеза фосфолипазы С, наблюдаемый в культуральной среде рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis*, трансформированного полученным вектором, зависимый от наличия индуктора, оказался низким. Поэтому целью работы было конструирование штамма *Bacillus subtilis*, обеспечивающего стабильную продукцию фосфолипазы С *Bacillus thuringiensis* без добавления индуктора.

Для достижения поставленной цели вектор рНТ255 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EgeI и BstPI. ДНК, обработанную эндонуклеазами, очищали при помощи разделения в 1%-м геле агарозы. Полученную ДНК обрабатывали Pfu-полимеразой при 72 °С в течение 10 минут. После обработки полимеразой ДНК очищали от компонентов буферного раствора. Затем проводили реакцию лигирования. Продуктами лигазной реакции трансформировали клетки *Escherichia coli* NebStable. Плазмидную ДНК выделяли из бактериальных клеток с помощью коммерческих наборов. Структуру полученной рекомбинантной плазмиды подтверждали секвенированием.

Чтобы оценить уровень синтеза фосфолипазы С *Bacillus thuringiensis* в клетках *Bacillus subtilis*, эти клетки трансформировали полученным вектором. Затем одиночные клоны высевали в жидкую питательную среду. Спустя 24 часа отбирали аликвоту культуральной среды и анализировали при помощи электрофореза в ПААГ. На полученной электрофореграмме наблюдали бенд, соответствующий по молекулярной массе фосфолипазы С *Bacillus thuringiensis*.

Литература

1. Меркульева Ю. А., Щербаков Д. Н., Бондарь А. А. Получение рекомбинантной фосфолипазы С *Bacillus thuringiensis* : мат-лы 56-й Междунар. науч. студ. конф. МНСК-2018: Биология. 2018. С. 64.

**ПОТЕНЦИАЛ *PHYSCOMITRELLA PATENS* КАК ИСТОЧНИКА
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**THE POTENTIAL OF *PHYSCOMITRELLA PATENS* AS A SOURCE
OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES UNDER VARIOUS CULTIVATION
CONDITIONS**

Е. Г. Терещенко, О. А. Иванов

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН
Беларуси, Минск, Беларусь*

E. G. Tereshenko, O. A. Ivanov

Institute of Experimental botany of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: protlife1984@gmail.com

Аннотация

Для мха *P. patens* описаны антимикробные пептиды (АМП), принадлежащие к липидпереносящим белкам (ЛПБ) и гевеиноподобным пептидам, уровни экспрессии которых тканеспецифичны и зависимы от условий культивирования растения. Прогнозируется наличие пептидных фрагментов гистонов H2A, H2B, H4 и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАДФ) с антимикробной активностью.

Abstract

For *P. patens*, antimicrobial peptides (AMPs) belonging to lipid transfer proteins (LTP) and hevein-like peptides are described. Their expression levels are tissue-specific and dependent on the cultivation conditions of the plant. The presence of peptide fragments of histones H2A, H2B, H4 and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) with antimicrobial activity is also predicted.

На протяжении 80 лет листоватый мох *P. patens* активно используется как модельный организм и в качестве значимого биотехнологического растения для получения веществ различной природы. *P. patens* также является объектом протеомных и пептидомных исследований. В ряде работ демонстрируется разнообразие пептидов, непосредственно кодируемых

в геноме, а также высвобождающихся из белков в результате ограниченного и функционально значимого протеолиза (криптидов), и широкая амплитуда изменений их состава при изменении условий культивирования.

Биоинформатический анализ совокупности наборов геномных, транскриптомных и протеомных данных представляет собой всеобъемлющую основу для идентификации генов-кандидатов, кодирующих предполагаемые АМП, самих АМП, а также криптоидов в *P. patens*.

В ходе выполненного анализа установлено, что у *P. patens* не представлено большинство групп антимикробных пептидов, характерных для растений. Выявлено только две группы последовательностей, классифицируемых как классические АМП: ЛПБ и гевеиноподобные пептиды. Для их преформ характерно наличие специфичных сигнальных последовательностей, обеспечивающих внеклеточный транспорт и секрецию. Гевеиноподобные пептиды представлены одной формой (Pr3c1_30410), кодируемой геном, расположенном на хромосоме 1 мха. Пептид экспрессируется во всех тканях растения, с наибольшими уровнями экспрессии в протонеме при культивировании на среде BCD с 0,5 % глюкозой, а также под действием метилжасмоната. ЛПБ представлены 20 формами и относятся к подклассу 2 этой группы белков. 6 ЛПБ не экспрессируются. Для 7 характерны слабые уровни экспрессии во всех тканях, вне зависимости от условий культивирования. Pr3c6_15620 и Pr3c7_3350 активно экспрессируются во всех тканях растения, наиболее выражено — в протонеме на среде BCD и освещении красным светом, а также в протонеме и гаметофорах на среде Кнопа. Для 5 ЛПБ характерна тканеспецифичная, зависящая от условий культивирования экспрессия — в спорофите на среде Кнопа (Pr3c19_18500, Pr3c21_18660, Pr3c22_7170, Pr3c8_1210) и в гаметофорах, выращенных на среде Кнопа и BCD (Pr3c5_8780).

В тканевых экстрактах и среде культивирования *P. patens* следует ожидать присутствия значительного числа криптоидов-дериватов гистонов H2A, H2B, H4 и ГАДФ. Для гистонов в совокупности предсказывается 25 потенциальных криптоидов, фактическое образование которых в различных условиях культивирования, а также точные границы последовательностей должны быть установлены масс-спектрометрически при анализе пептидомов мха. Для ГАДФ предсказано 20 криптоидов-продуктов протеолиза ГАДФ по N-концу. 17 из них представлены 32-36-мерными пептидами, 3 — 13-14-мерными. Как и в случае гистоновых дериватов, особенности образования ГАДФ-производных криптоидов при различных условиях культивирования *P. patens* будет определено в дальнейшем при анализе пептидомов.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ
НЕОРГАНИЧЕСКИХ И КОМПОЗИТНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ
ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ ***

**SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF INORGANIC AND COMPOSITE
NANOMATERIALS PROPERTIES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

В. К. Фоменко, Е. В. Дмитриенко

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

V. K. Fomenko, E. V. Dmitrienko

ICBFM SB RAS, Novosibirsk

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

Аннотация

В работе представлены разработанные и оптимизированные методы получения неорганических наночастиц и их композитов на основе наноматериалов диоксида кремния и карбоната кальция для биомедицинских применений. Полученные наночастицы исследованы в качестве наноносителей противоопухолевых лекарственных средств: доказана эффективность и оправданность применения конструкций в экспериментах *in vitro*.

Abstract

The paper presents the developed and optimized methods for the synthesis of inorganic nanoparticles and their composites based on silicon dioxide and calcium carbonate nanomaterials for biomedical applications. The resulting nanoparticles have been investigated as nanocarriers for anticancer drugs: the effectiveness and justification of using the constructs in *in vitro* experiments has been proved.

Неорганические наночастицы широко представлены в исследовательских разработках основ систем доставки терапевтических препаратов. Особое внимание направлено на создание контейнеров для противоопухолевых

© В. К. Фоменко, Е. В. Дмитриенко, 2020

* Работа выполнена при поддержке АААА-А17-117020210021-7 и РНФ 18-14-00357.

средств, способных к избирательному концентрированию и пролонгированному высвобождению лекарств, что приводит к снижению токсичности и повышению эффективности терапии. Несмотря на многочисленные поисковые работы и высокий потенциал идеи «умных» доставщиков, на сегодняшний день до клинической практики не допущен ни один препарат на основе неорганических наночастиц (НЧ), обладающий универсальной адресной и избирательной системой транспорта. Одной из проблем при конструировании подобных препаратов является поиск доступных методов синтеза стабильной монодисперсной суспензии нанометровых частиц удовлетворительного качества для применимости в биомедицине, способных к эффективному связыванию и высвобождению лекарственного средства.

В ходе данной работы разработаны воспроизводимые протоколы получения суспензии НЧ на основе диоксида кремния и карбоната кальция, а также их композитов, обладающих оптимальными параметрами для основ систем доставки противоопухолевых препаратов: наноразмерность (до 200 нм), монодисперсность, биосовместимость, а также рН-чувствительность. Для полученных наноматериалов, отвечающих требованиям применимости *in vivo*, рассмотрена возможность получения композитов на основе НЧ и биосовместимого полимера нейлона-6. Показана возможность УФ-иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности композитных наноматериалов, что позволяет использовать олигонуклеотид-направленную стратегию в системе доставки терапевтических средств в дальнейших исследованиях. Все полученные материалы охарактеризованы методами динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии, а также ИК-спектроскопии.

Для наноматериалов и их композитов изучены условия связывания и высвобождения противоопухолевого антибиотика — доксорубина. В модельных экспериментах показана высокая эффективность, рН-чувствительность и пролонгированность высвобождения как для НЧ на основе карбоната кальция, так и для диоксида кремния. С помощью МТТ-теста подтверждено отсутствие токсичности синтезированных НЧ, а также показана эффективность ингибирования роста клеток НЧ, несущими доксорубин, превышающая использование индивидуального антибиотика.

**СТРУКТУРНЫЙ ДИЗАЙН КОМПЛЕКСОВ Pt(II)
НА ОСНОВЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ КАРБОПЛАТИНА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКОЙ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

**STRUCTURAL DESIGN OF Pt(II) COMPLEXES BASED
ON NEW ANALOGUES OF CARBOPLATIN TO CREATE COMPOUNDS
WITH HIGH ANTITUMOR ACTIVITY**

М. В. Фомичёва^{1,2}, Т. А. Подругина³, А. А. Логвинов³, Е. Д. Никольская^{1,2},
М. Р. Молляева^{1,2}, М. Б. Сокол^{1,2}, Н. Г. Яббаров^{1,2}

¹ *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*

² *Всероссийский научный центр
молекулярной диагностики и лечения, Москва*

³ *Химический факультет МГУ, Москва*

M. V. Fomicheva^{1,2}, T. A. Podrugina³, A. A. Logvinov³, E. D. Nikolskaya^{1,2},
M. R. Mollaeva^{1,2}, M. B. Sokol^{1,2}, N. G. Yabbarov^{1,2}

¹ *IBCP RAS, Moscow*

² *RRCMDT, Moscow*

³ *MSU, Chemical faculty, Moscow*

E-mail: fom.marg@mail.ru

Аннотация

Для улучшения терапевтических свойств препаратов платины, создания эффективных препаратов в отношении резистентных опухолевых клеток и снижения общей токсичности синтезируют новые, структурно модифицированные аналоги Pt(II). Был проведен синтез новых структурных аналогов на основе 3-гидроксикарбоплатина и исследована зависимость активности комплексов от структуры лигандов в эксперименте по определению цитотоксической активности в отношении клеток линии A549 и H69. Лидерное соединение проявило активность в 22 раза большую, чем у карбоплатина.

Abstract

To improve the therapeutic properties of platinum preparations, create effective drugs against resistant tumor cells and reduce overall toxicity, new, structurally modified analogs

of Pt (II) are synthesized. The synthesis of new structural analogs based on 3-hydroxycarboplatin was carried out, and the dependence of the activity of the complexes on the structure of the ligands was investigated in an experiment to determine the cytotoxic activity against A549 and H69 cells. The leader compound was 22 times more active than carboplatin.

Известно, что опухолевые клетки и ткани, подвергшиеся химиотерапии, приобретают фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), выражающийся в снижении интенсивности накопления препаратов в трансформированных тканях и, как следствие, в уменьшении эффективности их действия. Актуальная задача на сегодняшний день заключается в создании новых аналогов противоопухолевых препаратов для преодоления МЛУ и увеличении их эффективности. В химиотерапии для лечения злокачественных новообразований применяют препараты платины (II), такие как цисплатин, карбоплатин (Крт) и оксалиплатин. Создание новых аналогов препаратов платины, структурно подобным утвержденным лекарственным формам, но обладающих улучшенными характеристиками является востребованным.

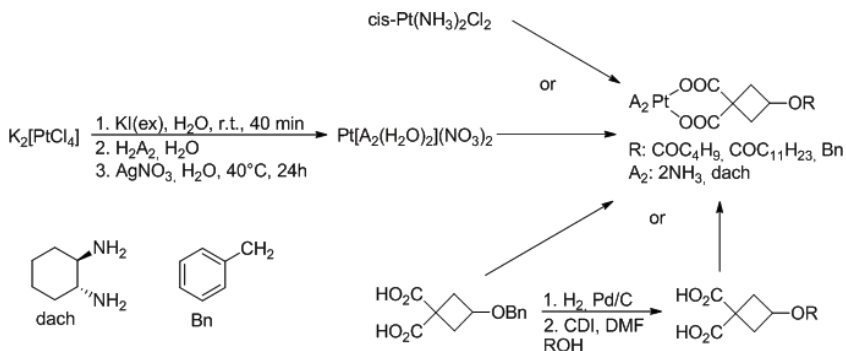


Схема синтеза новых аналогов Pt(II) на основе Крт

Был проведен синтез новых структурных модификаций на основе 3-гидроxicарбоплатина (см. рисунок) и исследована зависимость активности комплексов от структуры лигандов (см. таблицу).

Варьирование структурных фрагментов в базовом соединении — Крт, — обладающим известной противоопухолевой активностью, и проведение испытаний *in vitro* позволило выявить соединение-лидер (Крт5) и обозначить некоторые закономерности в зависимости структура-свойство.

Исследование цитотоксической активности новых аналогов Pt(II)

Название	R	A ₂	A549 IC50 (мкМ)	H69 IC50 (мкМ)
Крт3	Bn	2NH ₃	34,20	63,20
Крт5	COC₁₁H₂₃	2NH₃	3,25	3,10
Крт6	COC ₄ H ₉	2NH ₃	37,31	57,47
Крт7	Bn	dach	11,35	8,84
Карбоплатин (Крт)	—	2NH ₃	39,70	70,20

Был проведен анализ цитотоксической активности синтезированных соединений в отношении клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549 и мелкоклеточной карциномы легкого человека H69. Анализ проводили с помощью МТТ-теста. Из таблицы видно, что соединение Крт7 обладало активностью в 4–5 раз большей, чем у Крт. Соединения Крт6 и Крт3 проявили активность на одном уровне с Крт. Наибольшей активностью (в 12 раз эффективнее в отношении A549 и в 22,5 раза эффективнее в отношении H69 по сравнению с Крт) обладало соединение Крт5. Следовательно, увеличение длины алкильного заместителя способствует значительному повышению активности аналога.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой противоопухолевой активности новых синтезированных аналогов платины (II) по сравнению с коммерчески доступными препаратами сравнения — Крт.

ГИДРОЛАЗЫ КАК ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ БОРЬБЫ С ТОКСИГЕННЫМИ МИКРОМИЦЕТАМИ *

HYDROLASE AS AN ENZYMATIVE TOOL TO FIGHT TOXIGENIC MICROMYCETES

С. Р. Хабирова ¹, И. И. Идиятов ², Э. А. Шуралев ¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет

² Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности, Казань

S. R. Khabirova ¹, I. I. Idiiatov ², E. A. Shuralev ¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University

² Federal Center for toxicological, radiation, and biological safety, Kazan

E-mail: galliamova95@mail.ru

Аннотация

Среди многочисленных методов деструкции микотоксинов биodeградация микроорганизмами и ферментами является эффективным и перспективным подходом для устранения опасных свойств токсичных метаболитов грибов. Настоящее исследование — первый этап в изучении ферментов-гидролаз у отобранных антагонистов микромицетов *Aspergillus* и *Fusarium*. Результаты эксперимента показали, что отобранные штаммы обладают амилолитической активностью и, следовательно, являются потенциально способными к деградации грибов.

Abstract

Among the numerous methods for the destruction of mycotoxins, biodegradation by microorganisms and enzymes is an effective and promising approach to eliminate hazardous properties of toxic fungal metabolites. The present study is the first stage in the study of hydrolase enzymes in selected antagonists of micromycetes *Aspergillus* and *Fusarium*. The experimental results showed that the selected strains have amylolytic activity and, therefore, are potentially capable of fungi degradation.

Афлатоксин В1 и зеараленон являются опасными микотоксинами из-за их токсичности, канцерогенности и эстрогенности. Чтобы снизить их нега-

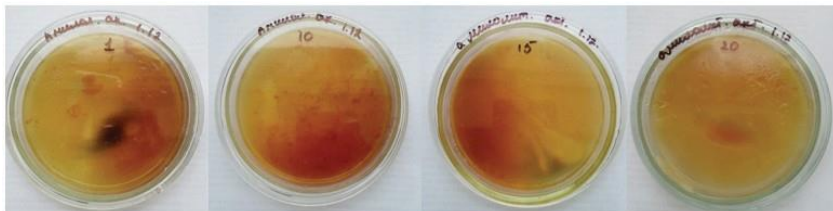
© С. Р. Хабирова, И. И. Идиятов, Э. А. Шуралев, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научно-го проекта № 20-316-90001.

тивное воздействие на людей и животных, необходимы успешные средства борьбы с их продуцентами. Применение микроорганизмов для биодegradации микромицетов может быть эффективным способом повышения безопасности пищевых продуктов и кормов для животных.

Целью настоящих исследований является изучение биологических особенностей отобранных микроорганизмов, в том числе их ферментативных свойств. В процессе многоступенчатого скрининга микроорганизмов-антагонистов плесневых грибов *Aspergillus* и *Fusarium* в модельных опытах *in vitro* и *in vivo* были отобраны безопасные микроорганизмы с высокой фунгицидной активностью и возможностью применения в качестве биопрепаратов по борьбе с токсигенными микромицетами. Для биодegradации микромицетов и микотоксинов у отобранных микроорганизмов необходимо наличие экзоферментов, относящихся к классу гидролаз. Это связано с тем, что условием эффективного лизиса патогенных грибов и/или использования грибного мицелия как источника питания является комплексное действие различных гидролитических ферментов.

В связи с этим в первую очередь была изучена амилолитическая активность отобранных микроорганизмов-антагонистов посредством культивирования на содержащей крахмал среде (состав среды: 10 г пептона, 5 г KH_2PO_4 , 2 г крахмала, 15 г агар-агара на 1 л дистиллированной воды). Питательную среду разлили по стерильным чашкам Петри, затем на застывшую поверхность среды штрихом по диаметру чашки провели высев исследуемого микроорганизма. Все чашки инкубировали в термостате при 37 °С. По истечении 4 сут. чашки извлекли из термостата и в каждую добавили по 3 мл раствора Люголя. При наличии крахмала среда окрашивалась в интенсивно синий цвет (что наблюдали в контроле), что свидетельствовало бы об отсутствии у исследуемого изолята амилолитической активности. Окрашивание среды в желто-бурый цвет — признак наличия способности к гидролизу крахмала (как показано на рисунке).



Результат исследования амилолитической активности
изолятов микроорганизмов

В результате исследования было выявлено, что отобранные изоляты-антагонисты микромицетов обладали амилалитической активностью. Данные штаммы, как было установлено ранее, обладают способностью к подавлению роста и развития микроскопических грибов, следовательно, необходимо более глубокое изучение и других ферментов-гидролаз.

ОСОБЕННОСТИ НОКАУТА ГЕНОВ В СУСПЕНЗИОННОЙ
КУЛЬТУРЕ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ПОМОЩИ
РНИ-КОМПЛЕКСОВ *

FEATURES OF KNOCKOUT GENES IN A SUSPENSION CULTURE
OF *ARABIDOPSIS THALIANA* USING RNP

С. А. Хозеева, Н. В. Пермякова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

S. A. Khozeeva, N. V. Permyakova

Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk

E-mail: khozeevasophie@gmail.com

Аннотация

Система редактирования генома CRISPR/Cas9 доказала свою эффективность, универсальность и простоту во многих исследованиях на клетках человека, животных, бактерий и растений. В частности, эта система открывает большой потенциал для селекции и исследования генома растений. Для того чтобы получить высокий процент эффективности мутагенеза, нужно учитывать множество факторов, таких как: тщательный подбор sgRNA, метод доставки системы и выбор селективного маркера. В своей работе мы использовали рибонуклеопротеидные комплексы (РНИ), состоящие из очищенного рекомбинантного фермента Cas9 и транскрибированной *in vitro* sgRNA, которые доставлялись в клетки *Arabidopsis thaliana* при помощи биобаллистики.

Abstract

The CRISPR / Cas9 genome editing system has proven its efficiency, versatility and simplicity in many studies on human, animal, bacterial and plant cells. In particular, this system opens up great potential for breeding and research of the plant genome. In order to obtain a high percentage of mutagenesis efficiency, many factors must be taken into account, such as: careful selection of sgRNA, method of delivery of the system and selection marker. In our work, we used ribonucleoprotein complexes (RNPs) consisting of purified recombinant Cas9 enzyme and *in vitro* transcribed sgRNA, which were delivered to *Arabidopsis thaliana* cells using biobalistics.

© С. А. Хозеева, Н. В. Пермякова, 2020

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 17-14-01099.

Использование культивируемых суспензионных клеток растений в качестве платформы для продукции рекомбинантных белков приобретает все большую популярность. Культура растительных клеток имеет несколько преимуществ для производства рекомбинантных белков, включая возможность изменения пути посттрансляционных модификаций, низкий риск вирусного заражения и низкую стоимость питательных сред. Отсутствие согласованной нормативной базы для фармацевтических препаратов, полученных из целых трансгенных растений, побудило к разработке суспензионных культур растительных клеток в качестве платформы для молекулярного производства, поскольку растительные клетки аналогичны другим системам на основе ферментеров, в отношении которых действуют правила для надлежащей производственной практики (GMP). Тем не менее есть необходимость в гуманизации пути N-гликозилирования белков в суспензионной культуре клеток растений. Инактивация эндогенных генов, ответственных за присоединение специфичных для растений гликановых структур, снизит потенциальную иммуногенность белков для человека.

В нашей работе мы использовали белок Cas9, смешанный с sgRNA, нацеленные на гены α -1,3-фукозилтрансферазы (*FucT11/12*) и β -1,2-ксилозилтрансферазы (*XylT*), кодирующие ферменты, переносящие специфичные для растений α -1,3-фукозу и β -1,2-ксилозу, которые отсутствуют у млекопитающих, бактерий и дрожжей.

Были проведены две биобаллистические трансформации суспензионной культуры клеток *A. thaliana* без отбора полученными РНП-комплексами, эффективность сайт-специфического мутагенеза составила по генам *FucT11/12* от 0,9 % до 3,4 %, а по гену *XylT* — от 2,5 % до 94,9 % (по результатам анализа TIDE). Также проведены две биобаллистические трансформации суспензионной культуры клеток *A. thaliana* с отбором и оптимизированными РНП-комплексами, где эффективность сайт-специфического мутагенеза составила: *FucT11* — 30 %, *FucT12* — 26,7 %, *XylT* — 33,3 % (по данным рестрикционного анализа).

Также было проведено исследование для дальнейшей модификации системы отбора отредактированных клеток. Был найден ген *AFB5*, нокаут которого дает устойчивость к гербициду пиклораму, что дает возможность оптимизировать селективный отбор в случае редактирования генома растения при помощи РНП.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА КОЛАНОВОЙ КИСЛОТЫ
НА ОРГАНИЗМ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

**STUDY OF THE BACTERIAL POLYSACCHARIDE COLANIC ACID
INFLUENCE ON MAMMALS ORGANISM**

С. А. Цветикова ¹, А. А. Забавкина ¹,
В. Г. Никонорова ², В. В. Криштоп ¹, Е. И. Кошель ¹

¹ *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

² *Ивановская государственная медицинская академия*

S. A. Tsvetikova ¹, A. A. Zabavkina ¹,
V. G. Nikonorova ², V. V. Chrishtop ¹, E. I. Koshel ¹

¹ *ITMO University, St. Petersburg*

² *Ivanovo State Medical Academy*

E-mail: zvetikova@scamt-itmo.ru

Аннотация

Взаимодействие между бактериями кишечника и организмом хозяина осуществляется с помощью ряда механизмов, в том числе посредством продукции метаболитов и крупных регуляторных молекул. Колановая кислота является бактериальным экзополисахаридом и в норме продуцируется под действием низких температур (до 20 °С), защищая бактерии от факторов внешней среды [1]. При исследовании нематод было обнаружено, что данный полисахарид способен влиять на их продолжительность жизни и на метаболизм [2]. В настоящем исследовании анализируется влияние колановой кислоты на метаболизм мышей и проводится предварительная оценка его токсических свойств.

Abstract

Interaction between intestinal bacteria and the host organism occurs through a number of mechanisms, including implication of metabolites and large regulatory molecules. Colanic acid is a bacterial exopolysaccharide and is normally produced under low temperatures (up to 20 °C), protecting bacteria from environmental factors [1]. When studying nematodes, it was found that this polysaccharide is able to affect their lifespan and me-

tabolism [2]. Current study analyzes the effects of colanic acid on mouse metabolism and provides a preliminary assessment of its toxic properties.

Выделение колановой кислоты (КК) проводилось по ранее описанному протоколу выделения образца, применяемого для культур клеток [2] из штамма *Escherichia coli* pBhya-SAB [3]. Согласно полученным результатам МТТ-теста, КК не обладает цитотоксичностью в диапазоне концентраций от 3,95 до 1000 мкг/мл при времени воздействия 72 часа в клеточных линиях НСТ-116 и IMR-32.

Для исследования *in vivo* токсичности КК были выбраны дозировки 2,7, 10,7, 16 и 21,3 мг в день. Наблюдение проводили в течение 30 дней, после чего животных (5 групп по 5 мышей) выводили из эксперимента. Во всех экспериментальных группах было отмечено повышение физической активности при сохранении нормального социального поведения. Фенотипические изменения (возникновение очагов алопеции) наблюдались во всех экспериментальных группах. Набор массы тела был снижен в сравнении с контрольной группой, за исключением группы, получавшей 10,7 мг КК в день. Было зафиксировано увеличение масс сердца и печени, а масса почек уменьшалась. Среди прочих эффектов при гистологическом анализе была отмечена потеря кардиомиоцитами исчерченности, что является признаком дистрофии.

КК обладает стимулирующим эффектом на млекопитающих, что выражается в повышении уровня физической активности. Однако, несмотря на отсутствие признаков цитотоксичности, данный образец КК вызывает признаки общей токсичности, причем развитие этих признаков зависит от времени получения и дозировки. Предполагается, что дальнейшая очистка может снизить уровень токсичности, что позволит рассматривать КК как вещество с широким потенциальным спектром применения.

Литература

1. Navasa N., Rodríguez-Aparicio L., Martínez-Blanco H. et al. Temperature has reciprocal effects on colanic acid and polysialic acid biosynthesis in *E. coli* K92 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 82, № 4. P. 721–729.
2. Han B. et al. Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity // *Cell.* 2017. Vol. 169, № 7. P. 1249–1262.
3. Wu H., Chen S., Ji M. et al. Activation of colanic acid biosynthesis linked to heterologous expression of the polyhydroxybutyrate pathway in *Escherichia coli* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 128. P.752–760.

**СТРУКТУРИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ
В ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ
ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ИНТЕНСИВНОСТИ ПИКСЕЛЕЙ**

STRUCTURING OF TISSUES IN OPTICAL COHERENT TOMOGRAPHY
BY MEANS OF ANALYSIS OF PIXEL INTENSITY

В. О. Черешнев, И. В. Кулешов

Тамбовский государственный технический университет

I. V. Kuleshov, V. O. Chereshev

Tambov State Technical University

E-mail: vitaliy-cha1999@yandex.ru

Аннотация

Представлены результаты исследования структурных изображений оптического когерентного томографа, в ходе которого получены гистограммы интенсивности пикселей, демонстрирующие различия в распределении среднего значения соответствующей аппроксимации гамма-распределения.

Abstract

The paper presents the results of a study of structural images of an optical coherence tomograph, during which histograms of pixel intensity were obtained, demonstrating differences in the distribution of the average value of the corresponding approximation of the gamma distribution.

Разрешающая способность современных ОКТ позволяет производить построение структурных изображений до микронного масштаба, однако исследования субклеточного уровня остаются все еще недоступными. Тем не менее есть некоторые свидетельства того, что анализ изображений спекл-структур ОКТ позволяет извлечь дополнительную информацию о клетках тканей *in vivo* [1].

Целью данной работы является выявление закономерных связей между структурными ОКТ-изображениями с помощью анализа изменения интенсивности пикселей отдельных частей изображений.

Основным объектом исследования являются структурные ОКТ-изображения кожных покровов и кровеносных сосудов человека *in vivo*, полученные при помощи нестандартной оптической системы на базе интерферометра Майкельсона.

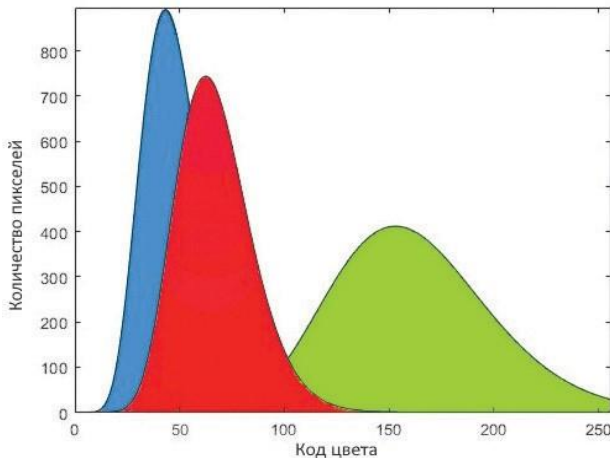
Для количественного выражения эффекта гетерогенности тканей произведено построение гистограммы интенсивностей пикселей, соответствующих участкам кожных покровов, кровеносных сосудов, крови и области без биоткани [2].

Для выявления закономерностей гистограмм, результаты аппроксимированы методом наименьших квадратов функцией гамма-распределения:

$$f(x, \alpha, \beta) = x^{\alpha-1} \frac{1}{\Gamma(\alpha)} \beta^\alpha e^{-\beta x},$$

где Γ — гамма функция Эйлера: $\Gamma(\alpha) = \int_0^\infty x^{\alpha-1} e^{-x} dx$, α — число степеней свободы, β — коэффициент масштаба.

Полученные распределения представлены для области кожи и сосуда отражают четкие различия в распределении интенсивностей пикселей и среднего значения α/β соответствующих графиков гамма-распределения, которое составило $\alpha/\beta = 2,7 \cdot 10^{-4}$ для области крови и $\alpha/\beta = 7,0 \cdot 10^{-4}$ для кожи, $\alpha/\beta = 8,0 \cdot 10^{-4}$ для области без биоткани. Теснота подгонки соответствует $R^2 \sim 0,95$, демонстрируя хорошее количественное соответствие обработанных данных.



Гамма-распределения, соответствующие гистограммам интенсивности пикселей для области воздуха (синий), крови (красный) и кожи (зеленый)

Таким образом, построение гистограммы интенсивности пикселей различных структур ОКТ-изображений с последующей подгонкой гамма-распределений демонстрирует возможность дифференциация различных тканей [3].

Литература

1. Черешнев В. О., Абдулкарим С. Н., Проскурин С. Г. Исследование отраженных и малократно рассеянных фотонов посредством построения матрицы дисперсий ОКТ изображений // Современные наукоемкие технологии. 2019. № 12-1. С. 118–122.
2. Черешнев В. О., Романенко И. М., Кулешов И. В. и др. Дифференциация структур кожи, кровеносных сосудов и крови посредством построения вариационной матрицы ОКТ изображения // Современные наукоемкие технологии. 2019. № 10 (Ч. 2). С. 319–323.
3. Черешнев В. О., Фролов С. В., Потлов А. Ю. и др. Построение ОКТ изображений биологических тканей на основе анализа интенсивности пикселей // Модели, системы, сети в экономике, технике, природе и обществе. 2019. № 3 (31). С. 104–112.

**РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВОЙ
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

**DEVELOPMENT AND USING PCR TEST SYSTEMS FOR DETECTING
CARBAPENEM RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

А. И. Чижикова^{1,2}, Е. С. Лисицына³, А. М. Стойнова^{1,2}

¹Российский университет дружбы народов, Москва

²Институт биохимической технологии и нанотехнологии, Москва

³ООО НПФ «Литех», Москва

A. I. Chizhikova^{1,2}, E. S. Lisitsyna³, A. M. Stoinova^{1,2}

¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

²Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology, Moscow

³ООО NPF «LYTECH», Moscow

E-mail: chizhikva-anna@list.ru

Аннотация

Инфекционные заболевания являются глобальной проблемой здравоохранения в 21 веке. Существует огромное количество штаммов бактерий, которые являются резистентными к антибактериальным препаратам и препаратам резерва. Такие резистентные микроорганизмы вызывают серьезные заболевания, которые имеют продолжительное лечение, высокую стоимость терапии. *Klebsiella pneumoniae* вызывает около 30 % поражений мочевыводящих путей, до 25 % госпитальных пневмоний и 17 % раневых. Для подбора правильного курса лечения, коррекции схемы лечения, снижения стоимости терапии и предотвращения распространения резистентных штаммов в стационарах необходима своевременная детекция карбапенем-устойчивой *Klebsiella pneumoniae*. Карбапенемазы трудно детектировать в рутинной практике, самым точным, чувствительным, надежным и дешевым методом станет разработанная ПЦР тест-система для выявления карбапенем-устойчивой *Klebsiella pneumoniae*.

Abstract

Infectious diseases are a global public health problem in the 21st century. There are a huge number of bacterial strains that are resistant to antibacterial drugs and reserve

drugs. Such resistant microorganisms cause serious diseases that have long-term treatment, high cost of therapy. *Klebsiella pneumoniae* causes about 30 % of urinary tract lesions, up to 25 % of hospital-acquired pneumonia and 17 % of wounds. To select the correct course of treatment, correct the treatment regimen, reduce the cost of therapy and prevent the spread of resistant strains in hospitals, timely detection of resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenem is necessary. Carbapenemases are difficult to detect in routine practice; the most accurate, sensitive, reliable and cheap method will be the developed PCR test system for the detection of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*.

K. pneumoniae клинически является наиболее значимой клебсиеллой, а также — причиной более 70 % человеческих инфекций из этого рода. У людей *K. pneumoniae* чаще всего локализуется в желудочно-кишечном тракте, на коже и в носоглотке. Является важной причиной возникновения серьезных инфекций в обществе, таких как некротическая пневмония, гнойные абсцессы печени, эндогенный эндофтальмит.

Для лечения инфекций, вызванных *K.pneumoniae*, используются цефалоспорины, фторхинолоны и триметоприм-сульфаметоксазол (котримоксазол). Устойчивость к данным антибиотикам обуславливает задержки в соответствующей терапии, а также рост заболеваемости и смертности у пациентов. Глобальные исследования 2000-х годов показали, что от 20 до 80 % *K.pneumoniae* устойчивы к антибиотикам первой линии, включая цефалоспорины, фторхинолоны, аминогликозиды и карбапенемы. Именно поэтому терапия по лечению внутрибольничных инфекций, вызванных данной бактерией, является сложной. Проблемой является приобретенная устойчивость к антибиотикам данной группы среди грамотрицательных бактерий, в особенности энтеробактерий. Формирование устойчивости связано с различными механизмами, но наиболее значимым является продукция карбапенемазы.

В настоящее время наблюдается тенденция к созданию комплексных мультиплексных систем, позволяющих проводить мультипараметрический анализ при минимальных затратах. В связи с этим создание мультиплексной ПЦР-тест-системы для обнаружения карбапенем-устойчивой *K.pneumoniae* представляется актуальной задачей.

Разработанная мультиплексная ПЦР тест-система для обнаружения карбапенем-устойчивой *K.pneumoniae*, продуцирующей карбапенемазы типов KPC и OXA48-like, отличается высокой специфичностью и чувствительностью, простотой и безопасностью работы, быстрым временем анализа (до трех часов). Логичным продолжением работ станет внедрение данной тест-системы в рутинную практику клинико-диагностических лабораторий, что позволит повысить качество проводимых бактериологических исследований.

**НАНОФОРМЫ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ:
ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ***

**NANOFORMS OF LIPOIC ACID: PRODUCTION AND STUDY
OF INFLUENCE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF PLATELETS**

В. А. Щелконогов^{1,2,3}, А. В. Шипелова¹, А. М. Синебрюхова¹,
Е. С. Дарнотук¹, Н. С. Шастина¹, О. А. Баранова^{2,3}, А. В. Чеканов^{2,3},
К. Д. Казаринов³, Э. Ю. Соловьёва², А. И. Федин²

¹*МИРЭА-Российский технологический университет (ИТХТ), Москва*

²*Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва*

³*Фрязинский филиал Института радиотехники и электроники
им. В. А. Котельникова РАН, Фрязино*

V. A. Shchelkonogov^{1,2,3}, A. V. Shipelova¹, A. M. Sinebryukhova¹,
E. S. Darnotuk¹, N. S. Shastina¹, O. A. Baranova², A. V. Chekanov²,
K. D. Kazarinov³, E. Y. Solovieva², A. I. Fedin²

¹*MIREA-Russian technological University (ITHT), Moscow*

²*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

³*Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics,
RAS (Fryasino branch), Fryasino*

E-mail: vasilii9999@yandex.ru

Аннотация

Были разработаны наночастицы (липосомы и нанодисперсии), содержащие липоевую кислоту (ЛК), с размером частиц от 50 до 250 нм, характеризующиеся 85 ± 10 % эффективностью включения (ЭВ) ЛК в наночастицы (НЧ), ее медленным высвобождением из наночастиц, а также обладающие высокой стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре. Более того, было установлено, что в на-

© В. А. Щелконогов, А. В. Шипелова, А. М. Синебрюхова, Е. С. Дарнотук, Н. С. Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, К. Д. Казаринов, Э. Ю. Соловьёва, А. И. Федин, 2020

* Исследования выполнены в рамках Государственного задания (№ гос. регистрации АААА-А19-100390063-9).

нодисперсиях (НД) удалось солюбилизовать ЛК в 1,5 раза выше (7 мг/мл), чем в липосомах (5 мг/мл), что является существенным преимуществом. Было показано, что липосомы и нанодисперсии с ЛК подавляют агрегацию тромбоцитов (Тц), обусловленную арахидоновой кислотой, и предложен механизм антиагрегационного действия.

Abstract

Nanoforms (liposomes and nanodispersions) with liponic acid (LA) with size of particles 50 — 250 nm were obtained and characterized by 85 ± 10 % encapsulation efficiency of LA in NP, its slow release from nanoforms, and possessing stability during long-term storage at room temperature. In addition, it has been found that in nanodispersions (ND) it was possible to solubilize LA 1.5 times higher (7 mg/ml) than in liposomes (5 mg/ml), which is a significant advantage. It has been established that liposomes and nanodispersions with LA inhibit platelet aggregation caused by arachidonic acid, and the mechanism of antiplatelet action was proposed.

Сосудистые заболевания головного мозга относятся к числу наиболее распространенных форм патологии ЦНС. Ежегодно более 15 млн человек во всем мире переносят инсульт [1]. К наиболее важным патогенетическим механизмам развития ишемического инфаркта головного мозга относят [2]: нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, воспалительные реакции, деструкцию ГЭБ и др. Терапия данной патологии включает применение препаратов, проявляющих антиоксидантное действие, подавляющих воспалительные процессы и препятствующих образованию тромбов. Одним из наиболее универсальных и перспективных антиоксидантов в комплексной терапии ишемии головного мозга является липоевая кислота. Однако она малорастворима в воде и, попадая в организм, быстро связывается с белками и биodeградирует под действием различных ферментов, что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия.

Поэтому **целью данной работы** является получение различных наноформ с ЛК для солюбилизации ЛК в водных растворах, их пролонгированного высвобождения, защиты от биodeградации при попадании в организм, а также исследование их влияния на функциональную активность тромбоцитов.

Вначале получали наноформы с ЛК: липосомы и нанодисперсии. Липосомы с ЛК получали из фосфатидилхолина (ФХ) методом «пассивной» загрузки, диспергируя липидную плкнку фосфатно-солевым буферным раствором (ФБР, pH 7,4) с последующей экструзией. Нанодисперсии «масло-в-воде» с ЛК получали методом ультразвукового диспергирования после инъекции ФБР и стабилизатора в органическую фазу, содержащую

ЛК и ФХ. Затем удаляли органический растворитель и избыток воды при пониженном давлении. Размер, индекс полидисперсности (ИП) и ζ -потенциал наночастиц определяли методом динамического и электрофоретического светорассеяния.

В результате проведенных исследований были получены фосфатидилхолиновые липосомы с ЛК и нанодисперсии с ЛК на основе ФХ, 0,4 % Плуороника Ф68 и ФХ, Ф68 в ФБР (рН 7,4). Размеры полученных наночастиц с ЛК колебались в диапазоне 50–250 нм, а значения ИП $< 0,23$, что подтверждало однородность наносuspensions. Полученные ЛК-наночастицы были электронейтральными (значения поверхностного заряда не превышали $-5,5$ мВ).

При сравнении характеристик полученных наночастиц ЛК (ФХ-липосом и НЭ) установили, что в нанодисперсиях удалось сольбилизовать ЛК в 1,5 раза, используя максимальную концентрацию ЛК 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 НД (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 два раза превышало содержание ФХ (ЛК:ФХ–2:1), в то время как в липосомах содержание ФХ значительно превышало содержание ЛК (ЛК:ФХ–1:8).

Нанодисперсии с липоевой кислотой на основе Плуороника 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 100 нм. Более того, было обнаружено, что полученные наночастицы с ЛК были стабильными при длительном хранении (более 12 месяцев) при комнатной температуре.

Методом крио-ПЭМ была изучена морфология наночастиц. Было обнаружено, что ФХ-липосомы в основном представляют собой гомогенную систему, состоящую из однослойных везикул. В свою очередь ФХ-НД представляют систему, состоящую из однослойных и мультислойных наноструктур сферической формы, практически не различающихся по размерам.

Далее изучали кинетику высвобождения ЛК из наночастиц при помощи диффузионной ячейки Франца, загружая в донорную камеру липосомы или НД, а в акцепторный отсек — ФБР. В результате исследований было обнаружено, что из ФХ-липосом за 24 часа высвободилось 45 ± 3 % ЛК, а из НД не более 60 %. Данный процесс высвобождения ЛК из НЧ может обеспе-

чить пролонгированное действие активной фармацевтической субстанции и поддержание ее терапевтической концентрации в крови.

На следующем этапе работы оценивали влияние полученных наночастиц ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц) в плазме крови, выделенной из крови, полученной у здоровых доноров. В качестве индуктора агрегации Тц использовали арахидоновую кислоту (АК), поскольку в результате ее действия образуются различные метаболиты, в том числе и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). В ходе проведенных исследований было обнаружено, что липосомы с ЛК (1–2 мМ) подавляют агрегацию тромбоцитов на 30–45 % относительно контроля. Все типы нанодисперсий с ЛК (1,3–3,8 мМ) эффективней на 35–80 % ингибировали агрегацию Тц, вызванную АК. В свою очередь водорастворимые препараты и наночастицы без ЛК практически не оказывали влияния на агрегацию Тц. Вероятнее всего ЛК в наночастицах способна лучше проникать внутрь клеток за счет взаимодействия липидов с мембраной клеток или в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Антиоксидантное действие наночастиц ЛК оценивали по содержанию тиобарбитурат активных продуктов (ТБК-АП) в образцах обогащенной Тц плазмы (ОТП), инкубированными с АК. В результате исследований было выявлено, что в процессе агрегации Тц, обусловленной АК, происходит окисление липидов в ОТП. При этом добавление липосом с ЛК или всех типов НД с ЛК к образцам плазмы крови приводило к значительному уменьшению концентрации ТБК-АП (1,5–16 раз). Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали все типы НД с ЛК при использовании максимальной концентрации ЛК. Кроме того, было обнаружено, что наночастицы, не содержащие ЛК, и водорастворимая форма ЛК незначительно влияли на образование продуктов ПОЛ в плазме крови при активации Тц с помощью АК. Предполагаемым механизмом антиагрегационного действия ЛК наночастиц можно считать ингибирование ею процесса инициирования продуктов ПОЛ с помощью АК.

Таким образом, на основании полученных результатов исследований можно сделать заключение о том, что наночастицы с ЛК являются перспективными для дальнейших исследований по оценке их нейропротекторного и антиагрегационного действия на различных экспериментальных моделях.

Литература

1. Benjamin E. J., Virani S. S., Callaway C. W. et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*. 2018. Vol. 137, № 12. P.67–492.
2. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. М. : Медицина, 2001. 328 с.

ЛЕГКО-МОДИФИЦИРУЕМЫЕ МНОГОЦЕЛЕВЫЕ
НАНО-НОСИТЕЛИ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ
НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ *

TUNABLE MULTIPLE-TARGETING DENDRITIC NANOSCAFFOLDS
FOR DIAGNOSTICS AND THERAPEUTIC APPLICATION

Н. Г. Яббаров, М. Б. Сокол,
Е. Д. Никольская, М. Р. Молляева, М. В. Фомичёва

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

N. G. Yabbarov, M. B. Sokol, E. D. Nikolskaya, M. R. Mollaeva, M. V. Fomicheva

IBCP RAS, Moscow

E-mail: marvint@inbox.ru

Аннотация

Антитела в качестве векторных молекул нашли широкое применение в дизайне препаратов направленного действия для диагностического и терапевтического применения. Однако неспецифические методы конъюгации с использованием низкомолекулярных химических агентов часто приводят к формированию нежелательных продуктов реакций, агрегатов, а использование ферментов требует многоступенчатой предварительной модификации конъюгируемых молекул. В нашей лаборатории был получен 15-членный пептид C-DCAWHLGELVWCT-N с замещенным остатком Glu9 на фторфенилпроизводное лизина, способный взаимодействовать в Fc-регионами антител крысы, человека, кролика и мыши в пределах наномолярных значений Kd, что позволяет модифицировать различные носители широким спектром антител практически в один шаг.

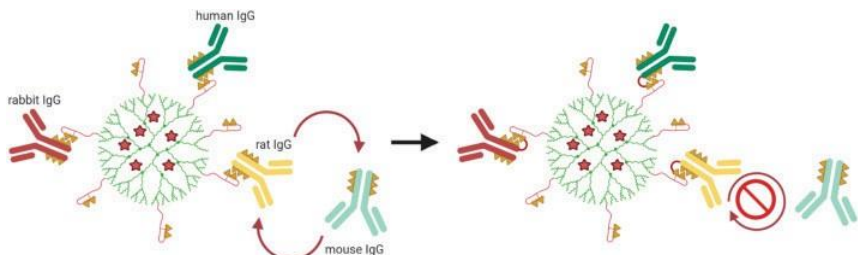
Abstract

Antibodies (Abs) conjugation with various scaffold has found application in therapeutics and diagnostics design. Cys and Lys are utilized as the basic moieties during the Ab conjugation. Often this strategy leads to formation of undesirable heterogeneous products.

© Н. Г. Яббаров, М. Б. Сокол, Е. Д. Никольская, М. Р. Молляева, М. В. Фомичёва, 2020

* The research was supported by Russian Foundation for Basic Research (contract № 18-29-09022\19).

Alternative approaches were developed to perform controlled modifications: incorporation of site-specific amino acid analogues; generation bioorthogonally reactive groups by enzymes; enzyme-mediated conjugation; conjugation of the thiol group of the substituted cysteine; conjugation via the N-terminal amine group. We designed 15 amino acids peptide (C-CDCAWHLGELVWCTC-N) analogue, with substituted Glu9 residue with fluorophenyllysine that able to interact with Ab Fc regions of different species.



General targeting scheme of nanocarriers modified with full-size antibodies applying the universal peptide linker

We design self-assembling easy-tunable simple and effective nanoscaffolds based on polyamideamine dendrimers. Carboxyl-terminated G4 dendrimers were coupled with the NH₂-PEG-COOH and the peptide via NHS-activated esters. Abs were conjugated with dendrimers, loaded with FAM, by adjusting pH from 7.4 to 8.5. The resulted conjugate characterized with 12–15 nm size, negative surface charge (-17 ± 2.2 mV), and ability to bind, besides human IgGs, also murine IgG2, rat IgG2c and rabbit IgG Abs. Z-domain competitive binding analysis displayed site-specific Fc-oriented dendrimer surface opsonization with Abs. SPR data analysis revealed 27 nM K_d value for Herceptin, 16 nM for mouse anti human CD326 IgG2b, and 48 nM for rabbit anti mouse IgG2c. MS data analysis confirmed covalent Abs binding with Lys248. The analysis revealed that: Her2⁺ A549 cells specifically internalized labeled with trastuzumab conjugates; mouse anti-human E-selectin labeled conjugates successfully penetrate stimulated HUVEC cells layer in vascular permeability assay; rabbit Abs modified conjugate effectively and reversible bound mouse HRP-conjugated IgGs. These results evidenced that the designed dendrimer-based conjugate have broad perspectives as the universal systems for development of drug delivery systems for therapy and diagnostics, biosensors, and can be applied *in vitro* and *in vivo*.

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПОДХОДЫ К СНИЖЕНИЮ УРОВНЯ ОШИБОЧНОСТИ В СОСТАВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ СБОРКИ ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ

CHEMICAL AND ENZYMATIC APPROACHES OF ERROR CORRECTION WITHIN SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES FOR GENE ASSEMBLY

К. И. Яковлева^{1,2}, И. С. Довыденко¹, Г. Ю. Шевелев^{1,2}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Новосибирский государственный университет*

K.I. Yakovleva^{1,2}, I.S. Dovydenko¹, G.Y. Shevelev^{1,2}

¹ *ICBFM SB RAS, Novosibirsk*

² *Novosibirsk State University*

E-mail: k.iakovleva7@g.nsu.ru

Аннотация

В данном исследовании был рассмотрен подход к устранению ошибок в составе протяженных нуклеотидных последовательностей путем модификации существующих протоколов химического синтеза олигонуклеотидов в совокупности с последующим использованием метода ферментативной коррекции. Применение данного подхода приводит к снижению доли ошибочных продуктов, вследствие чего наблюдается существенное уменьшение степени расщепления комплексов под действием эндонуклеаз.

Abstract

In this study the using the modification of the existing protocols for the chemical oligonucleotide synthesis approach for elimination errors in long oligonucleotide sequences was propose. Complexes application of this approach with enzymatic error correction leads to a decrease in erroneous products.

Синтез протяженных двухцепочечных ДНК имеет большое значение для геной терапии, молекулярной биологии, геной инженерии и синтетической биологии, так как позволяет создавать синтетические нуклеиновые кислоты с заданной последовательностью нуклеотидов без использова-

ния матрицы ДНК. Наличие ошибок в составе генных конструкций может приводить к потере биологической активности и является недопустимым ни в одной из сфер применения. Продукты реакции сборки часто содержат мутации, которые в большинстве своем являются результатом ошибок, накопленных при химическом синтезе олигонуклеотидов. Таким образом, основным недостатком высокоточного синтеза генов остается качество исходных олигонуклеотидов, используемых для сборки.

Данное исследование направлено на выявление типов ошибок в синтезируемых олигонуклеотидах и их устранение путем модификации существующих протоколов синтеза. В ходе выполнения работы было продемонстрировано, что использование усовершенствованных протоколов значительно снижает долю ошибочных продуктов. В сочетании с методом ферментативной коррекции ошибок, основанном на использовании эндонуклеаз, расщепляющих содержащую несоответствия двуцепочную ДНК [1], возможно значимо повысить качество продуктов химического синтеза олигонуклеотидов.

Литература

1. Sequeira A. F et al. T7 endonuclease I mediates error correction in artificial gene synthesis // *Molecular Biotechnology*. 2016. Vol. 58(8–9). P. 573–584.

раздел 2

БИОФИЗИКА

АКТИВАЦИЯ ОТОЛИТОВОГО АППАРАТА ВО ВРЕМЯ ТЕСТА ИМПУЛЬСА ГОЛОВЫ

ACTIVATION OF OTOLITH ORGANS
DURING HEAD IMPULSE TEST

А. Д. Абдыкеримов, В. П. Дёмкин, М. О. Плешков

Томский государственный университет

A. D. Abdykerimov, V. P. Demkin, M. O. Pleshkov

Tomsk State University

E-mail: method396@gmail.com

Аннотация

Целью работы являлось исследование функционирования отолитовых органов во время теста импульса головы. Отолитовый аппарат — часть вестибулярной системы, ответственной за восприятие положения головы, а также вектора гравитации и ускорений прямолинейных движений. Во время быстрых поворотов головы (например, во время теста импульса головы) на отолитовые органы действует сила инерции. Для оценки величины вклада центробежной силы в активацию отолитовых органов была использована физико-математическая модель динамики отолитов. В результате симуляции были получены значения ускорений отолитовых органов, в несколько раз превышающие пороговые значения их чувствительности.

Abstract

The aim of this work was to study the functioning of the otolith organs during the head impulse test. The otolith apparatus is a part of the vestibular system responsible for the perception of the position of the head, as well as the vector of gravity and acceleration of rectilinear movements. During rapid head turns (for example, during the head impulse test), inertial forces act on the otolith organs. To assess the value of the contribution of centrifugal force to the activation of the otolith organs, a physical and mathematical model of the dynamics of otoliths was used. As a result of the simulation, the values of the accelerations of the otolith organs were obtained several times higher than the threshold values of their sensitivity.

Отолитовый аппарат — важнейшая структурная часть вестибулярной системы человека, отвечающая за восприятие линейных ускорений головы и силы тяжести. Отолитовые органы имеют сложную структуру, состоящую из волосковых клеток — механорецепторов, которые укоренились в желе, называемом отолитовой мембраной, а поверх нее находится слой отокональных тел карбоната кальция. Таким образом, динамика этой системы очень близка к маятнику с критическим затуханием.

Для выявления отклонений в работе вестибулярного аппарата используются различные тесты. Все они в основном направлены на количественную оценку функции полукружных каналов. Например, тест импульса головы является общепринятым методом функционального тестирования шести полукружных каналов, заключающимся в резком повороте головы амплитудой 15–30° со скоростью около 150–300 градусов в секунду и одновременным фиксированием взгляда испытуемого на стационарном объекте, расположенном перед ним. Однако эта методика в том виде, в каком она была сформирована, не учитывает вклад отолитовых органов в вестибулоокулярный рефлекс в целом. Считается, что за восприятие поворотов отвечают только полукружные каналы, хотя при таких скоростях вращения головы отолиты неизбежно должны испытывать центробежное ускорение.

Для оценки величины ускорения, приложенного к отолитовым органам, нами была выбрана модель динамики, учитывающая силы вязкости и упругости и модифицированная для работы в неинерциальной системе отсчета при наличии вращения. В качестве внешнего стимула выступала центробежная сила. Форма стимула была рассчитана усреднением записей угловой скорости поворота головы 50 испытуемых во время теста импульса головы в горизонтальной плоскости. Расстояние от оси вращения до отолитовых органов было измерено из 20 снимков МРТ здоровых людей

с использованием свободного ПО 3D-Slicer. Для вычисления величины центробежных сил, приложенных к отолитовым органам, а также для расчета линейного смещения отолитовой мембраны использовался программный пакет Matlab.

В результате симуляции были получены значения ускорений отолитовых органов, в несколько раз превышающие пороговые значения их чувствительности (в $0,08\text{--}0,14\text{ м/с}^2$), а также смещение отолитовой мембраны как функция времени, где максимальное смещение мембраны равно $0,2\text{ мкм}$.

На основании полученных результатов выдвинута гипотеза о вкладе отолитов в вестибулоокулярную реакцию на поворот головы при больших скоростях (более $100^\circ/\text{с}$).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ТИОСЕМИКАРБАЗОНА Dp44mT И ЕГО КОМПЛЕКСОВ
СИОНАМИ ЦИНКА МЕТОДАМИ ЯМР И ХПЯ***

**INVESTIGATION OF THE PHOTOCHEMICAL PROPERTIES
OF THIOSEMICARBAZONE Dp44mT AND ITS COMPLEXES
WITH ZINC IONS BY NMR AND CIDNP**

А. С. Архипова^{1,2}, В. А. Тимошников¹, О. Ю. Селютина^{1,3}, Н. Э. Поляков^{1,3}

¹ *Институт химической кинетики
и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск*

A. S. Arhipova^{1,2}, V. A. Timoshnikov¹, O. Yu. Selyutina^{1,3}, N. E. Polyakov^{1,3}

¹ *Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk*

² *Novosibirsk State University*

³ *ISSCM SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: alinaarkhipova349@gmail.com

Аннотация

На протяжении многих лет тиосемикарбазоны (ТСК) привлекают значительное внимание ученых к своим химическим и биологическим свойствам. Также известно, что вещества ряда тиосемикарбазонов обладают фотохимической активностью, что открывает возможности для их использования в фотодинамической терапии. Однако работы по изучению механизмов таких реакций не проводились. В данной работе исследуются фотохимические свойства хелатора ионов металлов ди-2-пиридил-кетон-4,4-диметил-3-тиосемикарбазона Dp44mT и его хелатных комплексов с ионами цинка. Интерес к Dp44mT вызван тем, что данное вещество проявляет селективную противоопухолевую активность. Исследование проводилось методами ЯМР и химической поляризации ядер (ХПЯ).

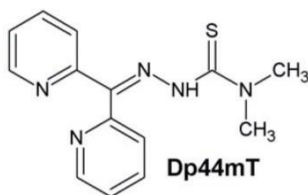
Abstract

For many years, thiosemicarbazones (TSC) have attracted considerable attention of scientists to their chemical and biological properties. It is also known that a number of

thiosemicarbazones have photochemical activity, which opens up possibilities for their use in photodynamic therapy. However, studies on the mechanisms of such reactions have not been carried out. In this work, the photochemical properties of the metal ion chelator di-2-pyridyl-ketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone Dp44mT and its chelate complexes with zinc ions are investigated. Interest in Dp44mT is due to the fact that this TSC exhibits selective antitumor activity. The study was carried out by the methods of NMR and chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP).

С 1950-х годов была обнаружена противораковая активность тиосемикарбазонов (ТСК). В литературе описано, что основным механизмом действия заключается в ингибировании рибонуклеотид редуктазы. Кроме этого, ТСК способны образовывать хелатные комплексы с ионами металлов, такими как железо, медь, цинк — жизненно важными элементами для нормального функционирования клеток, тканей и организма в целом. С этой особенностью связан другой механизм противоракового действия, основанный на неконтролируемой генерации активных кислородных радикалов. Кроме того, недавние исследования показали, что некоторые ТСК демонстрируют усиление противоопухолевой активности в фотоиндуцированных реакциях, однако детальный механизм действия описан не был [1, 2].

Таким образом, целью данной работы являлось исследование фотохимической активности ТСК Dp44mT (см. рисунок), а также его комплексов с ионами цинка в реакциях с участием доноров и акцепторов электрона. В качестве доноров были выбраны N-ацетил-замещенные аминокислоты тирозин и триптофан, а в качестве акцепторов выступали хиноны.



Структура тиосемикарбазона Dp44mT

На основании данных, полученных методами ЯМР и ХПЯ, был сделан вывод, что Dp44mT а также его комплексы с ионами цинка являются фотохимически активными при облучении светом 308 нм. Показано, что Dp44mT способен вступать в реакцию переноса электрона как с донорами, так и с акцепторами электрона.

Литература

1. Mrozek-Wilczkiewicz A. et al. Iron chelators in photodynamic therapy revisited: Synergistic effect by novel highly active thiosemicarbazones // ACS Med. Chem. Lett. 2014. Vol. 5. P. 336–339.
2. Mrozek-Wilczkiewicz A. et al. Iron chelators and exogenic photosensitizers. Synergy through oxidative stress gene expression // J. Cancer. 2017. Vol. 8. P. 1979–1987.

УПРАВЛЕНИЕ БИОПРОЦЕССАМИ
ПУТЕМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭМП НА ИХ БИОРИТМЫ

MANAGEMENT BIOPROCESS BY THE ACTION
OF EMF ON THEIR BIORHYTHMS

П. И. Бабич, В. Н. Зарубин

ООО «Сибирский инновационный центр», Новосибирск

P. I. Babich, V. N. Zarubin

LLC "Siberian innovation center", Novosibirsk

E-mail: sicenter@bk.ru

Аннотация

Рассматриваются теоретические и практические вопросы управления биопроцессами в живых организмах в результате электромагнитного воздействия на их биоритмы. На основе полученных результатов разработан метод ресинхронизирующей физиотерапии и аппарат «ФизиоМаг» для лечения заболеваний путем устранения десинхронозов.

Abstract

Theoretical and practical issues of management bioprocess in living organisms as a result of electromagnetic action on their biorhythms are considered. Based on the results obtained, a method of resynchronizing physiotherapy and the "PhysioMag" apparatus for treating diseases by eliminating desynchronosis have been developed.

Исследование относится к области хрономедицины/хронофизиотерапии. Согласно свойству ритмичности живой материи, все биопроцессы, протекающие в организме, носят колебательный характер и имеют свои биоритмы. Поэтому любое заболевание в организме сопровождается отклонением биоритмов от нормы — хронопатологией (десинхронозом). Таким образом, лечить заболевания можно не только путем воздействия на биопроцессы методами фармакотерапии, но и методами хронофизиотерапии путем коррекции отклонений, возникших в биоритмах больного организма, и устранения хронопатологий. Это открывает новое направление в области

биомедицины: управление биопроцессами в больном организме путем воздействия на их биоритмы соответствующей частотой ЭМП. Однако проблема заключается в отсутствии аппаратных методов лечения десинхронозов.

Для решения проблемы на основе явления усвоения ритма живыми организмами в компании разработан и запатентован метод ресинхронизации (восстановления) биоритмов в больном организме. С целью реализации этого метода разработан и запатентован аппарат хронофизиотерапии «ФизиоМаг», который прошел клинические испытания. 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 обеспечивает безопасность лечения, позволяет добиться гарантированного положительного терапевтического эффекта и относится к таргетной физиотерапии. Положительная динамика лечения на аппарате «ФизиоМаг» по отдельным заболеваниям превышает 95 %.

**СТРУКТУРНЫЙ ДИЗАЙН АНТИТЕЛА
ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
С ЦЕЛЬЮ РАСШИРЕНИЯ ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТИ ***

**BROADENING OF THE SPECIFICITY OF ANTIBODY AGAINST
TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS USING STRUCTURAL DESIGN**

И. К. Байков, Л. А. Емельянова, О. В. Голота,
Л. М. Соколова, Г. Б. Каверина, Н. В. Тикунова

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

I. K. Baykov, L. A. Emelianova, O. V. Golota,
L. M. Sokolova, G. B. Kaverina, N. V. Tikunova

ICBFM SB RAS, Novosibirsk

E-mail: ivan_baykov@mail.ru

Аннотация

Цель исследования — адаптировать антигенсвязывающую область перспективного антитела против вируса клещевого энцефалита для более прочного связывания с поверхностным гликопротеином E штаммов Сибирского и Европейского субтипов вируса. Был исследован эффект восьми мутаций по трем положениям антитела, в одном случае удалось добиться увеличения сродства в 2–2,5 раза. Результаты сопоставлены с результатами молекулярной динамики.

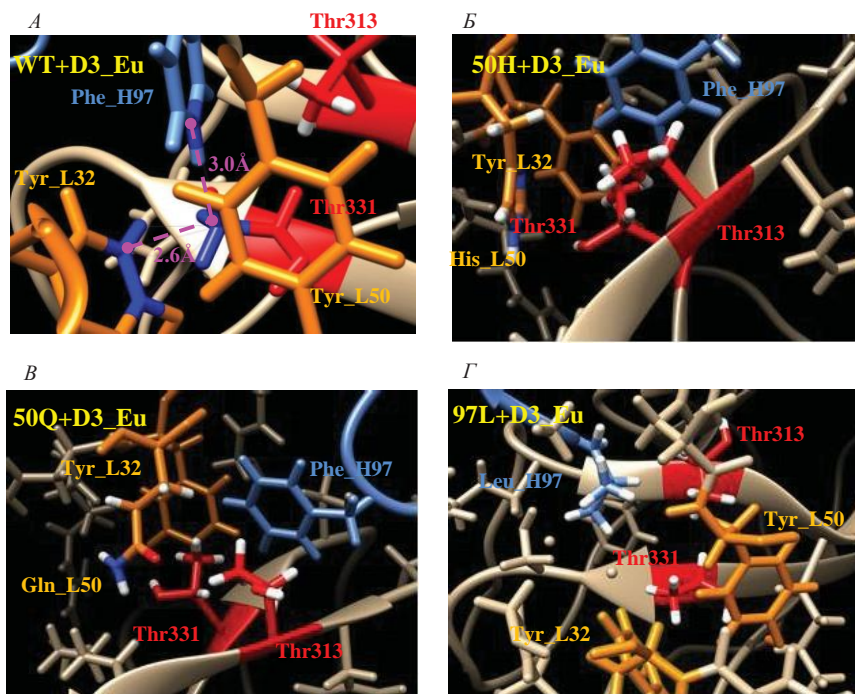
Abstract

The aim of the study was to modify the antigen-binding region of the promising antibody against the tick-borne encephalitis virus for stronger binding to envelope glycoprotein E of Siberian and European subtypes of the virus. The effect of eight mutations at three positions of the antibody was studied; in one case it was possible to achieve a twofold increase in affinity. The results are compared with the results of molecular dynamics simulations.

© И. К. Байков, Л. А. Емельянова, О. В. Голота, Л. М. Соколова, Г. Б. Каверина, Н. В. Тикунова, 2020

* Данная работа была выполнена при поддержке Фонда РФ, проект № 19-74-00107.

Создание терапевтических антител против вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) по-прежнему актуально, поскольку доля вакцинированного населения России составляет около 7 %, а во многих странах Европы этот показатель также низкий. Ранее было получено протективное химерное антитело chFVN145 против ВКЭ. Из-за различий в области эпитопа это антитело существенно прочнее (в 10–100 раз) связывается с рекомбинантным доменом D3 вирусного гликопротеина E штаммов Дальневосточного субтипа ВКЭ, нежели с аналогичными белками Сибирского или Европейского субтипов ВКЭ. **Цель исследования** — адаптировать антигенсвязывающую область этого антитела для более прочного связывания с рекомбинантными доменами D3 гликопротеина E Сибирского и Европейского субтипов ВКЭ (далее белки D3_Zau и D3_Eu).



Пространственные модели комплекса белка D3_Eu с исходным антителом (А — синим показаны атомы с перекрытием Ван-дер-Ваальсовых радиусов более 0,6Å) либо мутантными вариантами 50Н (Б), 50Q (В) и 97L (Г). Оранжевым и синим показаны легкие и тяжелые цепи антитела соответственно. Бежевым — домен D3. Красным выделены остатки 313 и 331 домена D3

На первом этапе была проанализирована пространственная структура комплекса «антитело-фрагмент вирусного гликопротеина Е». Поскольку в обоих целевых белках вместо остатка Ala313 находится более объемный Thr313 и происходит перекрытие с аминокислотными остатками антитела (см. рисунок, А), то были предложены восемь аминокислотных замен по трем положениям антитела, снижающих пространственные затруднения (некоторые структуры приведены на рисунке, Б, В, Г).

Антитела, каждое из которых содержало одну из этих мутаций, были получены в форме дисульфид-стабилизированных одноцепочечных антител. Измерение сродства мутантных антител к вирусным белкам с использованием биосенсора Proteon XPR36 показало, что в случае одного из мутантных антител (данные не опубликованы) удалось добиться увеличения сродства к белкам D3_Zau и D3_Eu в 2–2,5 раза. С помощью методов молекулярной динамики была предпринята попытка разработать протокол, который в будущем позволил бы с достаточной достоверностью оценивать *in silico* вклад предполагаемых мутаций и ранжировать варианты антител по степени сродства к целевым вирусным белкам.

В дальнейшем планируется исследовать эффект от введения других стабилизирующих мутаций, которые позволят более значительно увеличить сродство антитела к европейскому и сибирскому вариантам гликопротеина Е ВКЭ.

**РАСЧЕТ ДОЗОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ КОНВЕРСИИ
ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ С КОРМОМ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ
ЙОДА В ОРГАНИЗМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**CALCULATION OF DOSE CONVERSION FACTORS
WHEN INTRODUCED RADIOACTIVE IODINE ISOTOPES WITH
EATABLE IN THE CATTLE ORGANISM**

М. А. Басова, Э. Н. Денисова, Ю. А. Кураченко

*Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии
и агроэкологии, Обнинск*

M. A. Basova, E. N. Denisova, Yu. A. Kurachenko

Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk

E-mail: maribasova97@mail.ru

Аннотация

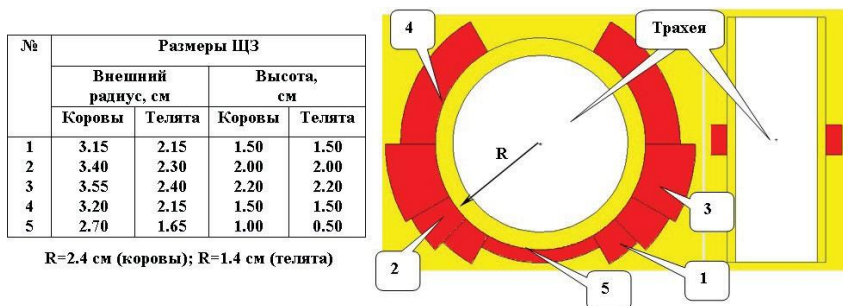
Аварии, происходящие на атомных станциях и исследовательских реакторах, сопровождаются выбросами в окружающую среду радиоактивных изотопов, в том числе радионуклидов йода, таких как ^{131}I , ^{132}I , ^{133}I и ^{135}I , поступающих в организм с пищей и воздухом. Опасность данного ряда изотопов в первые недели после ядерной аварии заключается в облучении щитовидной железы. Ранее нами были проведены расчеты критической дозы в щитовидной железе при экспериментальном кормлении телят и коров ^{131}I , а также получен коэффициент конверсии «Бк => Гр/с». В связи с этим целесообразно исследовать коэффициенты конверсии для остальных изотопов йода.

Abstract

Accidents at nuclear power plants and research reactors are accompanied by releases into the environment of radioactive isotopes, including radionuclides of iodine, such as ^{131}I , ^{132}I , ^{133}I and ^{135}I , entering the body with food and air. The danger of this series of isotopes in the first weeks after a nuclear accident is exposure to the thyroid gland. Previously, we calculated the critical dose in the thyroid gland during experimental feeding of ^{131}I calves and cows, and also obtained the conversion factor “Bq => Gy/s”. In this regard, it is advisable to study the conversion factors for the remaining isotopes of iodine.

Целью работы является расчет коэффициентов конверсии для радиоактивных изотопов йода, а именно ^{131}I , ^{132}I , ^{133}I и ^{135}I , путем моделирования щитовидной железы (ЩЖ) при помощи программы транспорта излучений MCNP.

ЩЖ крупного рогатого скота моделируется двумерным осесимметричным телом, состоящим из девяти сегментов, полученных осевыми и радиальными цилиндрическими сечениями. Эти сегменты симметрично расположены на трахее, имеют разный внешний диаметр и высоту, соединяются попарно, образуя четыре излучающих тела. Пятый источник имитирует перешеек (см. рисунок).



Радиальное (слева) и осевое сечение расчетной модели ЩЖ (MCNP5).
Таблица содержит размеры цилиндрических слоев ЩЖ

Размеры ЩЖ для коровы массой ~ 500 кг имеют средние значения $20,0 \text{ см}^3$ и $20,6 \text{ г}$, плотность ткани ЩЖ $\sim 1,03 \text{ г/см}^3$, элементный состав взят из литературных источников.

Изотопная активность распределена равномерно по объему ЩЖ. Точные расчеты (MCNP5) были проведены для: а) переноса β -излучения в ЩЖ, сопровождающегося образованием вторичного излучения и его дальнейшим переносом с учетом всех процессов, включая генерацию и транспорт тормозных, Оже-электронов и др.; б) переноса собственного γ -излучения ^{131}I с учетом генерации и транспорта рентгеновского и флуоресцентного излучений и др. Диссипация энергии контролировалась до 1 кэВ , интегральная (по энергии) дисперсия дозы составляла $< 0,1 \%$. Полученные коэффициенты конверсии для взрослых коров, учитывающие работу как β -, так и γ -источника, являются следующими:

- $^{131}\text{I} - 2,34 \cdot 10^{-12} \text{ Гр/с на 1 Бк}$;
- $^{132}\text{I} - 6,73 \cdot 10^{-12} \text{ Гр/с на 1 Бк}$;

- ^{133}I – $4,35 \cdot 10^{-12}$ Гр/с на 1 Бк;
- ^{135}I – $9,51 \cdot 10^{-12}$ Гр/с на 1 Бк.

Динамику каждого радиоактивного йода в ЩЖ не трудно рассчитать, используя камерную модель метаболизма. При помощи коэффициентов конверсии можно получить зависимость мощности дозы от времени, далее интегрированием вычисляется средняя доза в ЩЖ.

**СИЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО»,
ОЦЕНЕННЫЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

**FORCE CHARACTERISTICS OF INTERACTIONS
IN THE MODEL SYSTEM “ANTIGEN-ANTIBODY”
ESTIMATED USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY**

В. С. Белозёров, И. В. Коньшев, Л. Г. Дудина

*Вятский государственный университет, Киров
Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар*

V. S. Belozyorov, I. V. Konyshev, L. G. Dudina

*Vyatka State University, Kirov
Institute of Physiology of the Komi Scientific Center
of the Ural Branch of the RAS, Syktyvkar*

E-mail: belozerovvs@mail.ru

Аннотация

С использованием метода атомно-силовой микроскопии были оценены силовые характеристики межмолекулярного взаимодействия в модельной системе «антиген-антитело». Установлено наличие специфического компонента указанного взаимодействия, а также неспецифической составляющей, определяемой главным образом агрегацией молекул-сенситинов на минеральных носителях.

Abstract

The force characteristics of intermolecular interaction in the model system “anti- gen-antibody” were estimated using atomic force microscopy. The presence of a specific component of this interaction, as well as a non-specific component determined mainly by the agglomeration of sensitine molecules on mineral surfaces, has been identified.

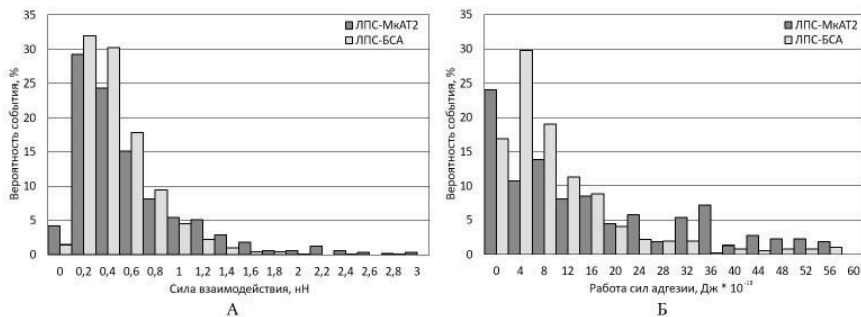
Атомно-силовая микроскопия (АСМ), наряду с оптической и магнитной ловушками, является одним из основных биофизических подходов для оценки силовых характеристик взаимодействия между биологическими микробиообъектами, такими как антиген-антитело, лиганд-рецептор и др.

Изучение механизмов таких взаимодействий лежит в основе разработки новых средств диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

Цель работы состояла в количественной оценке и изучении структуры силовых характеристик взаимодействия в системе «антиген-антитело» с использованием атомно-силовой микроскопии.

В эксперименте использовались АСМ-зонды серии PNP-DB с жесткостью консоли 0,06 нН/нм, имеющие радиус закругления иглы ~20 нм. Поверхность кантилевера покрывалась молекулами липополисахарида (ЛПС), выделенного методом водно-фенольной экстракции из бактериальной культуры *Yersinia pseudotuberculosis*, выращенной при температуре 10 °С. В качестве подложки использовалась слюда, функционализированная препаратом антител, специфических к О-боковому цепям указанного ЛПС (МкАТ2). Отрицательным контролем служила слюда, покрытая бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Силовые характеристики взаимодействия выражены в средних значениях силы разрыва связей и работе сил адгезии, а также в виде гистограмм распределения силовых характеристик, представленных на рисунке.



Гистограммы распределения для (А) силы взаимодействия и (Б) работы сил адгезии

На основе полученных данных были установлены достоверные различия ($p > 0,99$) в средних значениях силы взаимодействия «ЛПС-МкАТ2» ($0,719 \pm 0,062$ нН) в сравнении с взаимодействием «ЛПС-БСА» ($0,599 \pm 0,045$ нН). Характерной чертой специфического взаимодействия является наличие высокоамплитудных (>1 нН) разрывов связи. Для разры-

ва всех связей взаимодействия «ЛПС-МкАТ2» должна быть затрачена существенно большая работа по сравнению с системой «ЛПС-БСА».

Неспецифическая составляющая вносит значительный вклад в регистрируемые характеристики оцениваемых связей. Наличие такого неспецифического компонента может объясняться, помимо взаимодействия минеральных носителей целевых молекул, способностью ЛПС и МкАТ к самосборке и образованию агломератов на АСМ-зонде и подложке. Взаимодействие данных агломератов может приводить к образованию сложных комплексов с множеством связей как специфической, так и неспецифической природы. Выделение строго специфической компоненты во взаимодействии «антиген — антитело» остается одной из основных проблем силовой спектроскопии.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ОТВЕТА
МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ
В МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА ***

**STUDY OF THE HYPERPOLARIZATION RESPONSE OF ERYTHROCYTES
MEMBRANE IN THE MODEL OF METABOLIC SYNDROME**

Ю. Г. Бирулина, Е. Е. Буйко, Л. Ф. Алибаева, И. В. Петрова, С. В. Гусакова

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Yu. G. Birulina, E. E. Buyko, L. F. Alibaeva, I. V. Petrova, S. V. Gusakova,

Siberian State Medical University, Tomsk

E-mail: birulina20@yandex.ru

Аннотация

Воспроизведена модель диет-индуцированного метаболического синдрома (МС) на крысах. Потенциометрическим методом установлено, что амплитуда гиперполяризационного ответа (ГО) эритроцитов крыс с МС менялась разнонаправленно в зависимости от действующего агента: при стимуляции Ca^{2+} -ионофором A23187 — снижалась, при действии электронно-донорной системы аскорбат–феназинметасульфат — повышалась по сравнению с амплитудой ГО крыс контрольной группы.

Abstract

The model of diet-induced metabolic syndrome (MS) was performed in rats. The amplitude of the hyperpolarization response (HR) of erythrocytes was evaluated by the potentiometric method. It was shown that the amplitude of the HR of rat erythrocytes with MS changed depending on the acting agent: after stimulated with calcium ionophore A23187 — decreased, after the electron donor system was applied — increased compared to the amplitude of HR rats of the control group.

Нарушения со стороны системы крови, развивающиеся при метаболическом синдроме (МС) и сахарном диабете (СД) 2-го типа, часто приводят к изменению структурно-функционального статуса эритроцитов, которые

© Ю. Г. Бирулина, Е. Е. Буйко, Л. Ф. Алибаева, И. В. Петрова, С. В. Гусакова, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-143.2020.4).

традиционно служат моделью для изучения ионного транспорта плазматических мембран в норме и при патологии.

Целью данного исследования явилось изучение гиперполяризационного ответа (ГО) мембраны эритроцитов при метаболическом синдроме у крыс.

Исследование выполнено на крысах-самцах линии Wistar, которые были разделены на контрольную и опытную группу (по 11 и 12 животных в каждой группе). Крысы контрольной группы содержались на стандартной диете. Крысы опытной группы содержали в течение 12 недель на высокожировой и высокоуглеводной диете. Материалом для исследования служили осажденные эритроциты, которые получали путем центрифугирования (1000 g, 4°C) гепаринизированной крови животных. Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов использовали потенциометрический метод, основанный на том, что в присутствии протонофора СИССР распределение протонов зависит от МП (E_m): $E_m = RT/F (pH_i - pH_o)$, где pH_i и pH_o — значения pH цитоплазмы и среды инкубации соответственно.

Внесение в суспензию эритроцитов кальциевого ионофора A23187 (0,5 мкМ) либо электронно-донорной системы аскорбат (10 мМ)-феназинметасульфат (ФМС, 0,1 мМ) приводило к развитию гиперполяризационного ответа (ГО), который в обоих случаях обусловлен открыванием Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов. Амплитуда ГО, стимулированного A23187, снижалась у эритроцитов крыс с МС на 13 % ($n = 6, p < 0,05$) по сравнению с данными, полученными у животных контрольной группы. В то же время в этих условиях не отмечалось изменений скорости развития ГО и скорости восстановления МП эритроцитов крыс обеих групп. Амплитуда ГО, полученного при добавлении к суспензии эритроцитов электронно-донорной системы аскорбат-ФМС, повышалась на 17 % ($n = 6, p < 0,05$) у крыс с МС по сравнению с амплитудой ГО крыс контрольной группы. Также отмечалось повышение скорости восстановления МП эритроцитов крыс с МС, тогда как скорость развития ГО значительно не отличалась от параметров ГО эритроцитов крыс контрольной группы.

Полученные различия исследуемых параметров у крыс использованных групп, вероятно, связаны либо с конформационными нарушениями структурных белков Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов при МС, либо с нарушениями со стороны регуляторных белков, влияющих на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость эритроцитов.

ХОЛОДНАЯ ПЛАЗМЕННАЯ СТРУЯ КАК НОВЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОДХОД *

COLD PLASMA JET AS A NEW ANTITUMOR APPROACH

М. М. Бирюков ^{1,2}, Е. А. Патракова ^{1,2},
О. А. Коваль ^{1,2}, О. С. Троицкая ¹, Д. Е. Закревский ³

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова, Новосибирск*

M. M. Biryukov ^{1,2}, E. A. Patrakova ^{1,2}, O. A. Koval ^{1,2},
O. S. Troitskaya ¹, D. E. Zakrevsky ³

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

² *Novosibirsk State University*

³ *Rzhanov Institute of Semiconductor Physics SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: biryukov.mm@ya.ru

Аннотация

В ходе работы выявлены культуры опухолевых клеток, наиболее чувствительные к облучению холодной плазменной струей (ХПС), оптимизированы продолжительность и физические параметры облучения, позволяющие оказывать селективное воздействие. Показано, что облучение опухолей *in vivo* приводит к увеличению концентрации белка HMGB1 в сыворотке крови мышей-опухоленосителей.

Abstract

In this work, we analyzed cancer cells with the highest sensitivity to cold atmospheric plasma (CAP) treatment. To obtain the selective cytotoxic effect towards cancer cells, physical parameters of irradiation were optimized. We demonstrated the increase in serum HMGB1 level in tumor-bearing mice after the CAP irradiation.

© М. М. Бирюков, Е. А. Патракова, О. А. Коваль, О. С. Троицкая, Д. Е. Закревский, 2020

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-19-00255 и гранта РФФИ № 20-34-90021.

Одним из перспективных направлений терапии злокачественных новообразований является применение холодной плазмы для индукции гибели раковых клеток. Холодная плазма представляет собой ионизованный газ с температурой, не превышающей 40 °С. Частицы газа при взаимодействии с веществами окружающей среды запускают каскады реакций, приводящих к образованию активных форм кислорода и азота, которые обуславливают биологические эффекты плазмы.

Цель работы

Сравнение чувствительности культур клеток мыши и человека к облучению холодной плазмой, оптимизация параметров облучения и выявление механизмов клеточной гибели.

В работе применяли установку с газоразрядным устройством, созданную сотрудниками ИФП СО РАН. Культуры клеток мыши (СТ26, В16, МХ-7) и человека (MCF-7, MCF-10A, A549, Wi-38), растущие в 96-луночных планшетах, обрабатывали ХПС, после чего оценивали жизнеспособность в МТТ-тесте. Параллельно жизнеспособность клеток оценивали в реальном времени с помощью клеточного анализатора iCELLigence. Для анализа клеток в состоянии апоптоза применяли проточную цитометрию с окрашиванием Annexin V/PI. Визуализацию морфологии облученных клеток осуществляли с помощью системы ZOE. Для анализа противоопухолевого действия ХПС клетки МХ-7 в количестве $5 \cdot 10^5$ трансплантировали подкожно мышам линии СЗН/Не. Пальпируемые опухоли облучали ХПС в различных режимах. Для анализа влияния ХПС на иммунную систему проводили тестирование образцов сыворотки крови на секретируемые цитокины и хемокиноподобный белок HMGB1.

Определены условия облучения, обеспечивающие селективное цитотоксическое действие ХПС на онкотрансформированные клетки человека (MCF-7, A549) в сравнении с нормальными (MCF-10A, Wi-38) клетками того же гистологического происхождения. Среди исследуемых культур онкотрансформированных клеток мыши наибольшая чувствительность к ХПС выявлена для клеток рабдомиосаркомы МХ-7.

С помощью световой микроскопии установлено образование апоптотических телец в облученных клетках. Методом проточной цитометрии показано, что вследствие обработки ХПС доля клеток, на поверхности которых присутствует фосфатидилсерин, увеличивается с 6,8 до 17,9 %, что является одним из признаков гибели клеток по пути апоптоза.

В экспериментах *in vivo* на мышах линии СЗН/Не с трансплантированными подкожно клетками МХ-7 продемонстрировано двукратное увеличе-

ние концентрации HMGB1 в сыворотке крови мышей-опухоленосителей через 24 часа после обработки. Важно отметить, что такой эффект отсутствовал у здоровых мышей, облученных ХПС.

Полученные данные демонстрируют селективный цитотоксический эффект холодной плазмы в отношении онкотрансформированных клеток. Увеличение концентрации белка HMGB1 в сыворотке крови мышей-опухоленосителей говорит о вовлеченности иммунной системы в ответ на облучение.

**ОЦЕНКА ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМФИФИЛЬНЫХ
ТРИАЗИН-КАРБОСИЛАНОВЫХ ДЕНДРОНОВ *****ASSESSMENT OF HEMOLYTIC PROPERTIES OF AMPHIPHYLIC
TRIAZINE-CARBOSILANE DENDRONS**

О. С. Боева^{1,2,3}, Н. Ю. Кнауэр^{1,3}, Е. А. Пашкина^{1,3},
А. А. Актанова¹, В. И. Архипова^{2,3}, Х. Санчес-Ньевес⁴,
Ф. Х. де ла Мата⁴, Р. Гомес⁴, Е. К. Апарцин^{2,3}

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии, Новосибирск

² Новосибирский государственный университет

³ Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

⁴ Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica,
Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain

O. Boeva^{1,2,3}, N. Knauer^{1,3}, E. Pashkina^{1,3}, A. Aktanova¹, V. Arkhipova^{2,3},
J. Sánchez-Nieves⁴, F. J. de la Mata⁴, R. Gomez⁴, E. Apartsin^{2,3}

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

² Novosibirsk State University

³ ICBFM SB RAS, Novosibirsk

⁴ Department of Organic and Inorganic Chemistry,
University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain

E-mail: o.boeva@g.nsu.ru

Аннотация

В работе оценена гемолитическая активность новых систем доставки лекарств — триазин-карбосилановых дендронов. Нами показано, что инкубирование эритроцитов с дендронами в присутствии собственной сыворотки доноров значительно снижает дозозависимый гемолитический эффект дендронов. Полученные данные представляют интерес для дальнейшей разработки систем доставки лекарств.

© О. С. Боева, Н. Ю. Кнауэр, Е. А. Пашкина, А. А. Актанова, В. И. Архипова,
Х. Санчес-Ньевес, Ф. Х. де ла Мата, Р. Гомес, Е. К. Апарцин, 2020

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 18-33-20109_мол_а_вед,
гранта MINECO CTQ-2017-85224-P, гранта Президента РФ МК-2278.2019.4.

Abstract

In this work we studied the hemolytic properties of the new delivery system for drug — triazine-carbosilane dendrons. We showed that incubation of erythrocytes with dendrons in the presence of donors' own serum significantly reduced dose-dependent hemolytic effect. The data obtained are of interest for future development drug delivery system.

Современные системы лекарственной доставки должны обладать защитными свойствами по отношению к транспортируемой молекуле, быть безопасными и иметь низкую гемолитическую активность. В работе оценивалась гемотоксичность амфифильных карбосилановых дендронов второго и третьего поколений (DG2, DG3) — высокосимметричных молекул, способных к сборке в супрамолекулярные комплексы.

2%-я суспензия эритроцитов 12 условно здоровых доноров обрабатывалась растворами DG2 и DG3 (0,3 мкМ, 1 мкМ, 3 мкМ, 10 мкМ, 30 мкМ и 100 мкМ) в фосфатно-солевом буфере (PBS), в растворе альбумина (40 г/л) и в собственной сыворотке крови донора. В качестве отрицательного контроля использовалась суспензия без добавления растворов дендрона, а в качестве положительного контроля — 10% р-р Triton X-100. Образцы инкубировались 60 минут при 37 °С. Оценка уровня свободного гемоглобина проводилась спектрофотометрически. Статистическая обработка производилась с использованием критерия Манна — Уитни, различия достоверны при $p < 0,05$.

Нами показан дозозависимый эффект DG2 и DG3 при инкубации в PBS и растворе альбумина. Уровень гемолиза в сыворотке был достоверно ниже, чем в PBS и растворе альбумина. Мы полагаем, что дендроны активно связываются с компонентами донорской сыворотки, что значительно снижает их токсичность. Также обнаружено, что дендрон DG3 имеет большую гемолитическую активность, чем DG2.

Полученные данные представляют интерес для дальнейшей разработки систем доставки лекарств с использованием амфифильных карбосилановых дендримеров.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВНОГО ВОЗРАСТА ЭРИТРОЦИТОВ
МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ****DETERMINATION OF THE CONDITIONAL AGE OF ERYTHROCYTES
BY SCANNING FLOW CYTOMETRY**

А. В. Гисич^{1,2}, Е. С. Ястребова^{1,3}, Д. И. Строкотов^{1,4}

¹*Институт химической кинетики и горения
им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет*

³*НМИЦ им. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск*

⁴*Новосибирский государственный медицинский университет*

A. V. Gisich^{1,2}, E. S. Yastrebova^{1,3}, D. I. Strokotov^{1,4}

¹*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

³*National Medical Research Center E. N. Meshalkina, Novosibirsk*

⁴*Novosibirsk State Medical University*

E-mail: a.gisich@g.nsu.ru

Аннотация

Данная работа посвящена методам определения условного возраста эритроцитов с целью изучения их морфологических и функциональных свойств от времени нахождения в кровотоке.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) разработка подходов по определению условного возраста одиночного эритроцита;
- 2) применение предложенных подходов к исследованию 15 доноров и пациентов;
- 3) проверка гипотезы о наличии корреляции между особенностью (точкой перегиба) в возрастной функции популяции эритроцитов и содержанием гликированного гемоглобина.

В результате работы было опробовано три подхода определения возраста с различным учетом неравномерной скорости потери объема и гемоглобина в течении жизни эритроцита. Явной зависимости между возрастом точки перегиба и долей гликированного гемоглобина не наблюдается при всех используемых подходах, следовательно, тестируемая гипотеза в работе не проявила себя должным образом.

Видимо, поведение точки перегиба описывается другими физико-биологическими особенностями.

Abstract

This work is aimed on methods to determine the nominal age of erythrocytes in order to study their morphological and functional properties which depend on a spent time in the bloodstream. To achieve this goal, the following tasks were set:

- 1) development of approaches to determine the nominal age of a single erythrocyte;
- 2) application of the proposed approaches to the study of 15 donors and patients;
- 3) testing the hypothesis about the presence of a correlation between a feature (inflection point) in the age function of the erythrocyte population and the content of glycated hemoglobin.

As a result of the study, three approaches for determining the age were tested, taking into account the uneven rate of volume and hemoglobin loss during the life of the erythrocyte. The relationship between the age of the inflection point and the proportion of glycated hemoglobin is not observed for all the approaches used, therefore, the hypothesis being tested did not work properly. Apparently, the behavior of the inflection point is described by other physico-biological features.

В течение 100–120 дней жизни эритроциты претерпевают многочисленные изменения: уменьшается объем, содержание гемоглобина, площадь поверхности, образуются и опадают микровезикулы и многое другое. Причем начальные изменения объема и гемоглобина быстрые. Последующие изменения происходят медленно. Из литературных данных известно, что половина общего изменения происходит в течение первой недели в кровообращении. По истечении срока жизни эритроциты перерабатываются, выводятся организмом из кровотока и заменяются.

Возможность определения возраста эритроцитов способна улучшить диагностику сахарного диабета, наличие которого определяется уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c). Изменения средней продолжительности жизни эритроцитов достаточно, чтобы привести к клинически значимым различиям в содержании HbA1c у диабетиков с одинаковым средним уровнем глюкозы в крови. Более того, характеристика популяции эритроцитов по возрастным показателям дает возможность обнаружить нарушения в организме, связанные с дисфункцией эритропоэза и элиминации эритроцитов.

Эксперименты проводились при комнатной температуре в течение четырех часов после забора донорской периферической крови (в EDTA). Эритроциты измерялись на оригинальном сканирующем проточном цитометре (разработанном в лаборатории), позволяющем регистрировать угловые зависимости (индикатрисы) светорассеяния от одиночных клеток, находящихся в водном потоке, со скоростью до 1000 клеток в секунду.

Таким образом, в ходе работы был разработан подход по определению условного возраста эритроцитов, основанный на корреляции параметров «объем эритроцита — количество гемоглобина». По результатам исследования доноров/пациентов найдена нелинейность корреляции в области малых объемов эритроцитов. Доказано отсутствие связи между особенностью в возрастной функции популяции эритроцитов и содержанием HbA1c.

**СОЗДАНИЕ ПОДХОДОВ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ
ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ***

**DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR PREDICTING THE
PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF COMPLEXES
OF NUCLEIC ACID DERIVATIVES**

В. М. Гольшев^{1,2}, А. А. Ломзов¹, Д. В. Пышный¹

¹*Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
²*Новосибирский государственный университет*

V. M. Golyshev^{1,2}, A. A. Lomzov¹, D. V. Pyshnyi¹

¹*ICBFM SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

E-mail: golyshev@niboch.nsc.ru

Аннотация

Разработка подходов для рационального дизайна и быстрого достоверного анализа свойств новых производных нуклеиновых кислот является актуальной задачей химии и физической химии. Нами разработаны подходы экспериментальной характеристики физико-химических свойств коротких олигомеров новых производных нуклеиновых кислот, и опробованы методы компьютерного моделирования, которые позволяют предсказывать особенности их структуры и гибридизационных свойств.

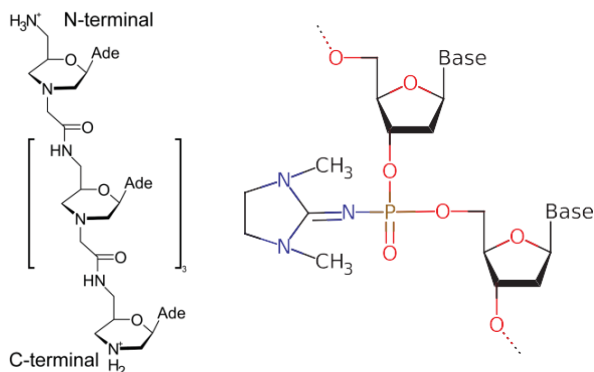
Abstract

The development of approaches for rational design and rapid reliable analysis of the properties of new nucleic acid derivatives is an urgent problem in chemistry and physical chemistry. We have developed approaches for the experimental characterization of the physicochemical properties of short oligomers of newly synthesized nucleic acid derivatives, and have tested computer simulation approaches for the prediction of their complexes structure and hybridization properties.

© В. М. Гольшев, А. А. Ломзов, Д. В. Пышный, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90127 и РНФ № 18-14-00357.

Олигонуклеотиды и их производные используют для исследования молекулярно-биологических процессов в качестве терапевтических агентов и диагностических зондов. Их применение основано на способности образовывать комплексы с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот. Существует большое число производных нуклеиновых кислот, среди которых наиболее распространенными являются фосфотиоатные производные (PS), замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA), пептидил-нуклеиновые кислоты (PNA), морфолиновые производные (PMO). В ИХБФМ СО РАН были предложены два типа производных: глицин-морфолиновые (gM) и фосфорил-гуанидиновые (PG) олигонуклеотиды. Целью данной работы является создание подходов для изучения и предсказание физико-химических свойств новых производных нуклеиновых кислот.



Структура производных нуклеиновых кислот gM (слева) и PG (справа)

Разработана термодинамическая модель, позволяющая определять термодинамические параметры формирования отдельных структурных элементов тандемных комплексов НК как нативных, так и модифицированных, с использованием коротких олигонуклеотидов (например, пентамеров). С использованием методов молекулярной динамики разработаны алгоритмы создания компьютерных моделей, проведения моделирования и анализа структуры и гибридизационных свойств данных производных. Показано, что *in silico* методы позволяют адекватно характеризовать структуру аналогов НК, а величины энергий гибридизации близки к экспериментально наблюдаемым величинам.

Сравнительное исследование структуры и термической стабильности комплексов gM и PG производных и нативных комплексов нуклеиновых кислот методом молекулярной динамики показало: а) возможность образования стабильных двойных спиралей в обоих случаях; б) близость энергий формирования отдельных структурных элементов, рассчитанных на основании анализа МД-траекторий, оказываются близки к экспериментально определенным величинам.

Полученные результаты показывают возможность рационального дизайна новых производных *in silico* и возможность достоверного прогностического расчета их свойств.

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ
ОПТИМАЛЬНЫХ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
СОБАК ПОРОДЫ РОТВЕЙЛЕР**

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING
INDIVIDUAL OPTIMAL MORPHOMETRIC PARAMETERS OF DOGS
OF ROTTWEILER BREED**

Т. А. Гончарова, А. А. Печерицын

Томский государственный университет

T. A. Goncharova, A. A. Pecheritsyn

Tomsk State University

E-mail: goncharovata.biomed@yandex.ru

Аннотация

В кинологическом стандарте каждой породы описаны значения морфометрических параметров, считающиеся оптимальными. В связи с несовершенством стандартов большой индивидуальной изменчивостью внутри породы и различиями в содержании и уровне активности отдельных представителей породы эти значения не являются оптимальными для каждой отдельной собаки. В данной работе предложен подход, предусматривающий построение математической модели тела собаки.

Abstract

The cynological standard of each breed describes the values of morphometric parameters that are considered optimal. Due to imperfect standards, large individual variability within the breed and differences in the content and level of activity of individual representatives of the breed, these values are not optimal for each individual dog. In this paper, an approach is proposed that provides for the construction of a mathematical model of the dog's body.

Традиционно для оценки тела собаки измеряют более десяти различных морфометрических параметров. В данной работе были сделаны измерения шести параметров: роста, длины корпуса, обхвата груди, ширины груди, глубины груди, обхвата пясти. Проведены измерения 38 собак породы рот-

вейлер старше года. На основе полученных данных были посчитаны индексы, отражающие пропорциональность телосложения. Для каждой собаки по результатам осмотра и пальпации был определен индекс кондиции тела. Индекс определялся по визуальной 9-точечной шкале, рекомендованной WSAVA (см. рисунок).



Шкала индексов кондиции тела собак, рекомендованная Всемирной ветеринарной ассоциацией мелких животных (*World Small Animals Veterinary Association*)

В качестве параметров, описывающих физическое состояние тела собаки, в данной работе используются значения зоотехнических индексов костистости K , массивности M , компактности C и грудного индекса G . Текущее состояние тела задается точкой в четырехмерном пространстве параметров K, G, M, C . В таком подходе поиск оптимального состояния тела собаки — это задача определения параметров $K_{\text{opt}}, G_{\text{opt}}, M_{\text{opt}}, C_{\text{opt}}$, для которых расстояние от идеального состояния минимально.

Зоотехнические индексы следующим образом связаны с морфометрическими параметрами

$$K = \frac{l_p}{h} \cdot 100, G = \frac{w_g}{x_g} \cdot 100, M = \frac{l_g}{h} \cdot 100, C = \frac{l_g}{l}$$

где l — длина корпуса собаки, h — высота в холке, l_p — обхват пясти, l_g — обхват груди, x_g — глубина груди, w_g — ширина груди.

Для каждого параметра найдена его линейная регрессия по остальным переменным и вычислен показатель VIF (*variance inflation factor*), который связан с коэффициентом детерминации R^2 соотношением

$$VIF = \frac{1}{(1 - R)^2}.$$

Параметр, для которого VIF максимален и превышает некоторое пороговое значение, был отброшен. Эта процедура повторялась для оставшихся параметров до тех пор, пока значение VIF для всех переменных не стало меньше порогового.

Вычисления проделаны с помощью свободного ПО Gnumeric. В результате найдено, что независимыми переменными являются длина корпуса l , обхват пясти l_p , обхват груди l_g и ширина груди w_g , а высота в холке и глубина груди зависят от переменных l и l_g :

$$x_g = a_1 l + a_2 l_g, h = b_1 l + b_2 l_g.$$

Для реализации вышеописанной модели была написана программа на встроенном языке ПО Matlab 2015b. С помощью нее проведены расчеты идеального состояния для 38 собак породы ротвейлер.

Анализ результатов этих расчетов показывает, что данная модель может применяться для расчета оптимальных параметров состояния тела у кобелей, у сук — с осторожностью. Для увеличения точности результатов предложенного метода необходимо увеличить выборку изученных объектов для повышения репрезентативности данных. Также необходимо включить в математическую модель дополнительные параметры, например, длину лап, обхват головы, возраст, тип конституции и т. д.

ОЦЕНКА ГЕНЕРАЦИИ АФК НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ, ОБЛАДАЮЩИХ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ*

ESTIMATION ROS GENERATION ON THE SURFACE OF MAGNETIC PARTICLES WITH PEROXIDASE-LIKE ACTIVITY

М. Г. Горобец, М. И. Абдуллина, М. В. Лопухова, А. В. Бычкова

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

M. G. Gorobets, M. I. Abdullina, M. V. Lopuhova, A. V. Bychkova

IBCP RAS, Moscow

E-mail: maria.g.gorobets@gmail.com

Аннотация

С использованием субстратов оФДА и ТМБ продемонстрирована генерация активных форм кислорода (АФК) в растворах магнитных наночастиц (МНЧ), пероксидазы хрена (HRP) и Fe(II) в присутствии пероксида водорода. Для МНЧ показана зависимость количества продуктов окисления от концентрации МНЧ в золе, обусловленная присутствием Fe(II) на поверхности частиц. Также исследовано влияние белка на генерацию АФК на поверхности МНЧ.

Abstract

The generation of reactive oxygen species (ROS) in solutions of magnetic nanoparticles (MNPs), horseradish peroxidase and Fe(II) is demonstrated in presence of hydrogen peroxide using oPDA and TMB. It is shown that the quantity of the oxidized products depends on the concentration of MNPs in sol. This effect is caused by presence of Fe(II) on the surface of MNPs. Influence of the protein on the ROS generation on the MNPs surface is also studied.

МНЧ в течение последних десятилетий используются при создании функциональных материалов биомедицинского назначения, например, для адресной доставки лекарственных веществ, магнитной сепарации и магнитно-резонансной томографии. МНЧ при физиологических условиях об-

© М. Г. Горобец, М. И. Абдуллина, М. В. Лопухова, А. В. Бычкова, 2020

* Исследование выполнено при частичной поддержке гранта Президента РФ МК-3601.2019.3.

ладают активностью пероксидазы и каталазы, содержащих в своем составе гем (комплексное соединение с железом). Данные МНЧ получили название IONzymes. IONzymes вызывают генерацию АФК под действием пероксида водорода и замедляют рост опухолей.

Целью данного исследования было изучение процессов генерации АФК под действием МНЧ и пероксида водорода. Для оценки генерации АФК использовались *o*-фенилендиамин (оФДА), продукт окислительной модификации которого имеет максимум поглощения при 418–455 нм, и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), образующий при взаимодействии с АФК продукт с максимумом поглощения при 370, 450 и 650 нм.

Показана генерация радикалов в системах, содержащих МНЧ, с использованием оФДА (рис. 1) и ТМБ (рис. 2). С использованием оФДА также продемонстрирована генерация радикалов в растворах HRP и Fe(II) в присутствии пероксида водорода (см. рис. 1). В данных растворах генерация радикалов обусловлена взаимодействием железа с пероксидом водорода.

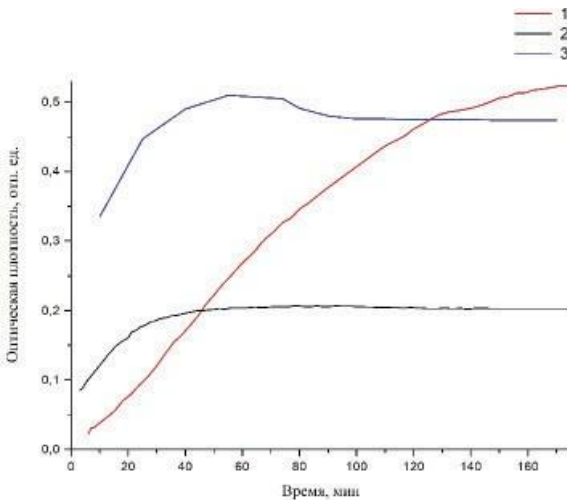


Рис. 1. Кинетика генерации продукта окисления ($\lambda_{\max} = 418$ нм) 0,07 мМ оФДА под действием: 1 — МНЧ 0,037 мг/мл + 9,8 мМ H_2O_2 (базовая линия от МНЧ); 2 — $3,6 \cdot 10^{-8}$ мМ HRP + 0,036 мМ H_2O_2 ; 3 — 0,07 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,84 мМ H_2O_2

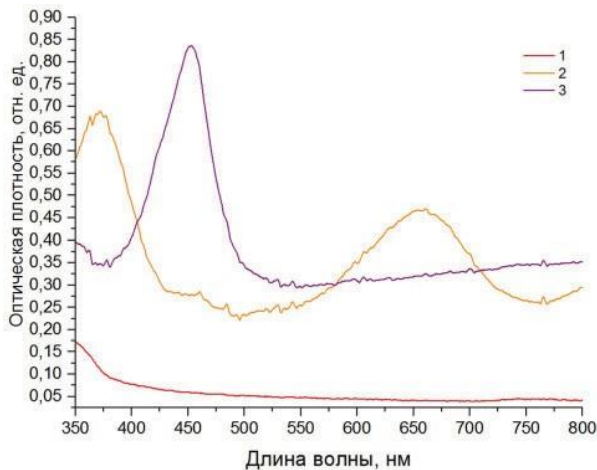


Рис. 2. Спектры УФ-/видимой области систем, содержащих: 1 — МНЧ 0,012 мг/мл; 2, 3 — МНЧ 0,012 мг/мл + 0,25 мМ ТМБ + 210 мМ H_2O_2 до (2) и после (3) добавления стоп-реагента (1 н H_2SO_4)

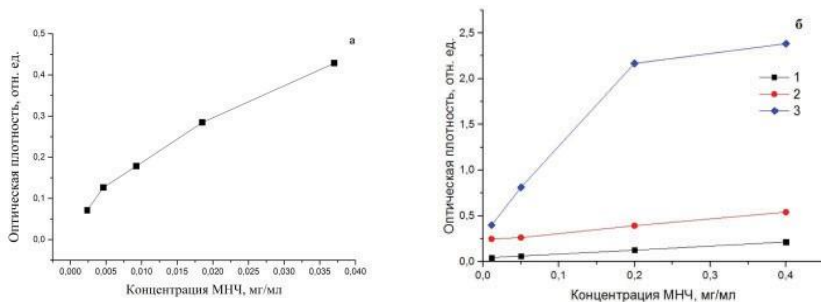


Рис. 3. Зависимость оптической плотности ($\lambda_{\text{max}} = 418$ нм для оФДА, $\lambda_{\text{max}} = 450$ нм для ТМБ) от концентрации МНЧ в системах: (а) 0,07 мМ оФДА + 9,8 мМ H_2O_2 + МНЧ (базовая линия от МНЧ), (б) МНЧ (1); 0,25 мМ ТМБ + МНЧ + 210 мМ H_2O_2 до (2) и после (3) добавления стоп-реагента (1 н H_2SO_4)

Генерация продуктов окисления оФДА и ТМБ зависит от концентрации МНЧ в растворе в диапазоне концентраций МНЧ 0,0025–0,036 мг/мл (для оФДА) и 0,0037–0,37 мг/мл (для ТМБ) (см. рис. 2). Показано, что данный

эффект обусловлен присутствием железа (II) на поверхности МНЧ (в отсутствие железа (II) на поверхности МНЧ окисленный оФДА не генерируется). Для ТМБ отмечено, что системы, содержащие стоп-реагент (1 н H_2SO_4), демонстрируют более значительный рост по сравнению с системами, в которые стоп-реагент не был добавлен.

Также исследовано влияние белка на генерацию окисленного оФДА под действием МНЧ и H_2O_2 . В присутствии человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) отмечено снижение образования окисленного оФДА, вероятно, обусловленное снижением процесса генерации радикалов на поверхности МНЧ вследствие образования белкового слоя на поверхности МНЧ (рис. 3).

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СЕНСОРНОЙ ГИСТИДИН-КИНАЗОЙ*

STRUCTURAL STUDIES OF SIGNAL TRANSDUCTION BY A BACTERIAL SENSOR HISTIDINE KINASE

И. Ю. Гушчин, А. А. Ремеева, И. М. Гончаров, В. В. Назаренко, Ю. Л. Рыжиков

Московский физико-технический институт

I. Yu. Gushchin, A. A. Remeeva, I. M. Goncharov,
V. V. Nazarenko, Yu. L. Ryzhikov

Moscow Institute of Physics and Technology

E-mail: ivan.gushchin@phystech.edu

Аннотация

Для получения информации об окружающей среде большинство бактерий использует трансмембранные белки-сенсоры. Примером такого сенсора является реагирующая на нитраты и нитриты гистидин-киназа NarQ из кишечной палочки. Ранее нами были получены кристаллографические структуры фрагментов NarQ в различных состояниях. В данной работе представлена информация об очистке полноразмерной NarQ, а также восстановлении ее атомарной структуры при помощи методов молекулярного моделирования и малоуглового рентгеновского рассеяния.

Abstract

In order to get information about their environment, most of bacteria utilize transmembrane sensor proteins. An exemplary sensor is nitrate- and nitrite-responsive histidine kinase NarQ from *Escherichia coli*. Previously, we determined crystallographic structures of fragments of NarQ in different conformations. In this work, we present the data about purification of full length NarQ and its atomistic structure obtained using molecular modeling and small angle X-ray scattering.

Многие бактерии и другие микроорганизмы живут в быстро меняющихся условиях окружающей среды. Для реакции на изменения в большинстве

© И. Ю. Гушчин, А. А. Ремеева, И. М. Гончаров, В. В. Назаренко, Ю. Л. Рыжиков, 2020

* Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (РНФ), проект №18-74-10053.

случаев они используют трансмембранные белки-сенсоры, детектирующие события вне клетки и посредством структурных перестроений передающие эту информацию внутрь клетки [1]. Несмотря на важность сигнальных систем для жизнедеятельности бактерий, а также их роль во многих бактериальных заражениях, механизмы работы трансмембранных сенсоров до сих пор не до конца изучены. Так, атомарная структура трансмембранного сегмента известна лишь для нескольких белков, тогда как каждый вид бактерий насчитывает десятки сенсоров. Более того, ни для одного из трансмембранных белков пока не получена полноразмерная структура высокого разрешения. Причиной этого являются сложности в работе с мембранными белками, а также общая динамичность как самих сигнальных белков, так и их комплексов с белками-партнерами.

Одним из наиболее хорошо изученных бактериальных сенсоров является реагирующая на нитраты и нитриты гистидин-киназа NarQ из кишечной палочки. NarQ состоит из семи структурных доменов: периплазматического сенсорного домена, трансмембранного домена и внутриклеточных доменов НАМР, S-helix, GAF-like, DНр и СА (каталитический домен). Ранее нами были получены структуры фрагментов NarQ, содержащих три первых домена — как в присутствии природного лиганда, аниона NO_3^- , так и в его отсутствие [2–4]. На основе данных структур был расшифрован механизм передачи информации о связывании лиганда сенсорным доменом внутрь клетки посредством поршнеобразных движений составляющих трансмембранный домен α -спиралью относительно друг друга.

Тем не менее для полного понимания механизма передачи сигнала гистидин-киназами вообще и в частности сенсором NarQ, требуется восстановление структуры полноразмерного белка в активном и неактивном состояниях. Нами была проведена очистка образцов полноразмерной NarQ, солюбилизированной как в детергенте (DDM), так и в сополимерах стирена и малеиновой кислоты (SMA). Показано, что при помощи обоих подходов можно получить образцы высокой чистоты, однако для образцов в DDM наблюдался повышенный протеолиз, а также агрегация. Использование SMA позволяет сохранить мембраноподобное окружение белка, однако получаемые частицы мембраны обладают большой гетерогенностью.

Полученные образцы полноразмерной NarQ были разделены при помощи гель-фильтрационной хроматографии и изучены методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Показано наличие в растворе частиц с радиусами гирации в диапазоне 100–150 Å, а также соответствие кривых рассеяния модели белка, построенной на основе полученных ранее структур и моделей по гомологии для тех доменов, структура которых на данный момент не-

известна. Полученные результаты показывают перспективность использования сополимеров SMA для солюбилизации мембранных белков, а также сочетания молекулярного моделирования и малоуглового рентгеновского рассеяния для получения информации о динамичных сигнальных белках.

Литература

1. Gushchin I., Gordeliy V. Transmembrane Signal Transduction in Two-Component Systems: Piston, Scissoring, or Helical Rotation? // *BioEssays*. 2018. Vol. 40. P. 1700197. <https://doi.org/10.1002/bies.201700197>.
2. Gushchin I., Melnikov I., Polovinkin V. et al. Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases // *Science*. 2017. Vol. 356 P. eaah6345. <https://doi.org/10.1126/science.aah6345>.
3. Gushchin I., Melnikov I., Polovinkin V. et al. Crystal Structure of a Proteolytic Fragment of the Sensor Histidine Kinase NarQ // *Crystals*. 2020. Vol. 10. P. 149. <https://doi.org/10.3390/cryst10030149>.
4. Gushchin I., Orekhov P., Melnikov I. et al. Sensor Histidine Kinase NarQ Activates via Helical Rotation, Diagonal Scissoring, and Eventually Piston-Like Shifts // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. P. 3110. <https://doi.org/10.3390/ijms21093110>.

**ПРОБЛЕМЫ СРАВНЕНИЯ СИСТЕМ
ЭЛЕКТРООКУЛОГРАФИИ И ВИДЕООКУЛОГРАФИИ
ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ТЕСТА ИМПУЛЬСА ГОЛОВЫ**

**COMPATIBILITY PROBLEMS OF ELECTROOCULOGRAPHY
AND VIDEOOCUOGRAPHY SYSTEMS DURING A HEAD IMPULSE TEST**

В. А. Зайцев, М. О. Плешков

Томский государственный университет

V. A. Zaycev, M. O. Pleshkov

Tomsk State University

E-mail: vasilysushi@gmail.com

Аннотация

На сегодняшний день самыми распространенными методами детектирования движения глаз являются видеоокулография (ВОГ) и электроокулография (ЭОГ). В рамках данной работы был проведен тест импульса головы с помощью обеих методик и выявлены проблемы совместимости данных систем.

Abstract

The most common eye-tracking methods are video-oculography (VOG) electrooculography (EOG) nowadays. In this study, the head-impulse test was performed using VOG and ENG methods both and then compatibility problems of these systems were determined.

Вестибулярная система играет ключевую роль в ориентации организма в пространстве, поддержке равновесия и стабилизации взгляда во время движения.

Тест импульса головы — один из общепринятых методов диагностики вестибулярного аппарата. Во время теста происходит быстрый поворот головы небольшой амплитуды, что в свою очередь вызывает вестибулокулярный рефлекс — движение глаз в сторону, противоположную движению головы. Вестибулярная функция оценивается на основании характера движения глаз относительно движения головы.

Существует ряд методов отслеживания и записи движения глаз, среди которых наиболее простыми и как следствие распространенными являются видеоокулография (ВОГ) и электроокулография (ЭОГ). Оборудование для ВОГ представляет собой очки с камерой, которая определяет ориентацию оптической оси глазного яблока в пространстве, а также детектирует угловую скорость головы при помощи встроенных гироскопов. Суть метода ЭОГ заключается в снятии корнео-ретиального потенциала глаза, изменяющего свою ориентацию в пространстве при повороте. Для этого на лицо пациента крепится до восьми электродов: справа и слева от глаза (для детектирования горизонтального движения) и сверху и снизу (для детектирования вертикального движения). В предыдущих наших работах была показана принципиальная возможность применения ЭОГ для проведения теста импульса головы.

Однако на данный момент нет информации о надежности результатов, полученных при помощи данной методики.

В настоящей работе было проведено сравнение ЭОГ и ВОГ путем одновременной записи движения глаз обоими методами во время проведения теста импульса головы в горизонтальной плоскости. Запись сигналов осуществлялась устройствами MPAQ (Maastricht, the Netherlands) и ICS Impulse (GN Optometrics, Taastrup, Denmark), представляющих методы ЭОГ и ВОГ соответственно. На лицо добровольца были прикреплены электроды ЭОГ слева и справа для каждого глаза, а поверх электродов были надеты очки ВОГ. Обе системы калибровались по трем точкам, расположенным в линию на расстоянии $7,5^\circ$ друг от друга. Обработку данных производили в пакете Matlab r2014b.

После предобработки (удаление шумов, передискретизация) сигналы скорости глаз обеих систем и скорости головы были выровнены по времени с использованием кросс-корреляции. Из имеющихся сигналов были получены пиковые скорости глаз и головы для каждого проведенного импульса головы.

Далее было проведено сравнение систем по следующим показателям: пиковая скорость глаз, отношение пиковых скоростей глаз и головы, а также форма сигналов.

В результате исследований были выявлены такие проблемы, как несоответствие формы сигналов различных систем и асимметрия влево, что на данный момент не позволяет сделать вывод о достоверности сигнала ЭОГ для расчета ключевых параметров теста импульса головы.

Обозначенные проблемы связаны, прежде всего, с различием в физических принципах, на которых основана запись сигналов методами ЭОГ и ВОГ.

В дальнейшем для верификации полученных сигналов необходимо сравнение методов ЭОГ и ВОГ с «золотым стандартом», так называемым методом Search Coil Technique.

**ПОИСК НОВОГО ТИПА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА *****SEARCH FOR A NEW TYPE OF SPATIAL ORGANISATION
OF NUCLEIC ACIDS IN HUMAN GENOME**

А. А. Замосковцева ^{1,2}, А. А. Ломзов ^{1,2}, М. Р. Кабилов ¹, Д. В. Пышный ¹

¹*Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
²*Новосибирский государственный университет*

A. A. Zamoskovtseva ^{1,2}, A. A. Lomzov ^{1,2}, M. R. Kabilov ¹, D. V. Pyshnyi ¹

¹*ICBFM SB RAS, Novosibirsk*
²*Novosibirsk State University*

E-mail: zamosk_n@mail.ru

Аннотация

Обнаружен новый тип пространственной организации нуклеиновых кислот, названный псевдоузлом TW-типа. В данной работе разработан алгоритм биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей генома человека, которые потенциально могут образовывать такие структуры, а также проанализирована принадлежность найденных участков генам, интронам и экзонам.

Abstract

A new type of spatial organization of nucleic acids, called the TW-type pseudoknot, was found. In this work, we developed an algorithm for bioinformatic analysis of the human genome that can potentially form this structure type. We analysed the localization of the sequences to genes, introns or exons.

Недавно в ИХБФМ СО РАН был обнаружен новый тип пространственной организации нуклеиновых кислот. Этот самоограниченный комплекс, содержащий два двуцепочечных фрагмента и одноцепочечные петли между ними, был назван псевдоузлом TW-типа. Цель работы — определить воз-

© А. А. Замосковцева, А. А. Ломзов, М. Р. Кабилов, Д. В. Пышный, 2020

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (20-04-00719) и в рамках государственного задания № А-0309-2016-0004.

возможность реализации псевдоузлов TW-типа цепочками ДНК живых систем и изучить их свойства.

Для этого мы предложили граничные условия на размеры нуклеотидных последовательностей, необходимые для образования псевдоузлов TW-типа, такие как ограничение длин отдельных блоков. С учетом сформулированных условий разработан алгоритм биоинформатического поиска последовательностей, которые потенциально могут образовывать псевдоузел TW-типа. На его основе был написан скрипт на языке Python, который мы применили для анализа генома человека. Рассмотрены и обнаружены структуры с двуцепочечными блоками длиной от 5 до 20 пар оснований. Возможность формирования псевдоузлов TW-типа обнаруженными последовательностями проверена с использованием программного пакета RNAstructure [1]. Для создания модельной системы выбрана наиболее представленная структура, которая встречается более 200 раз в нашей выборке и равномерно распределена по всем хромосомам. Образование псевдоузлов TW-типа одной цепью ДНК было подтверждено методами термической денатурации с оптической регистрацией сигнала, гель-электрофореза и атомно-силовой микроскопии. Анализ биологической роли таких структур в геноме человека был проведен с помощью BLAST [2] и BEDTools. [3] Проанализирована принадлежность полученных последовательностей генам, интронам или экзонам. Начаты экспериментальные исследования физико-химических и молекулярно-биологических свойств выбранных нуклеотидных последовательностей.

Литература

1. Reuter J. S., Mathews D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis // BMC Bioinformatics. 2010. Vol. 11. P. 129.
2. Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215(3). P. 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
3. Aaron R. Qu., Ira M. H. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features // Bioinformatics. 2010. Vol. 26, Iss. 6. P. 841–842.

СРАВНЕНИЕ И АНАЛИЗ РАЗЛИЧИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МАГНИТНЫХ НАОЧАСТИЦ *IN VITRO*

COMPARISON AND ANALYSIS OF DIFFERENCES IN BIOLOGICAL PROPERTIES OF MAGNETIC NANOPARTICLES *IN VITRO*

А. Р. Ильясов, Т. Р. Низамов

*Национальный исследовательский технологический университет
«МИСиС», Москва*

A. R. Iliasov, T. R. Nizamov

National University of Science and Technology MISIS, Moscow

E-mail: ilyasov.1997@inbox.ru, nizamov.timur@gmail.com

Аннотация

В ходе работ по исследованию воздействия наночастиц различного строения на опухолевые клетки *in vitro* в низкочастотном магнитном поле мы обнаружили интересное явление: два типа наночастиц, очень близких с точки зрения физико-химических свойств, существенно отличались влиянием на жизнеспособность клеток. По результатам серии проведенных экспериментов и анализа научных публикаций было предложено объяснение обнаруженному явлению, а именно: гибель клеток при их инкубации с наночастицами в переменном низкочастотном магнитном поле зависит от количества частиц и степени их агрегации внутри везикул клеток.

Abstract

We carried out experiments to study an effect of different magnetic nanoparticles in a low-frequency magnetic field on tumor cells *in vitro* and discovered an interesting phenomenon: two types of nanoparticles having similar physicochemical properties significantly differed in their effect on cell viability. Based on experiments results and scientific publications analysis, a phenomenon explanation was proposed, namely, whether cells die or not when they are incubated with nanoparticles in an alternating low-frequency magnetic field depends how closely nanoparticles aggregate in vesicles inside cells.

В лаборатории были получены наночастицы типа ядро-оболочка с диаметром магнитного ядра 10 нм из магнетита (Fe_3O_4). После этого одна группа наночастиц была дополнительно покрыта оболочкой из диоксида крем-

ния (SiO_2), а другая нет. Для обеспечения стабильности в водных растворах обе группы наночастиц были покрыты ПАВ полиэтиленгликолем (ПЭГ). Тестом на цитотоксичность полученных образцов служил стандартный спектрофотометрический MTS-метод. На первый день клетки культуры РС3 высаживались в 96-луночный планшет в концентрации 10 тыс./лунка. На второй день в лунки добавлялись наночастицы в концентрации 150 мкг/мл. Спустя 24 часа инкубации наночастиц с клетками, планшеты были помещены в низкочастотное переменное магнитное поле с амплитудой 100 мТл и частотой 180 Гц. На 4-й день эксперимента в лунки закапывался MTS-краситель. Полученные результаты демонстрировали отсутствие влияния наночастиц без оболочки из диоксида кремния в низкочастотном магнитном поле на выживаемость клеток. В то время как выживаемость клеток, к которым добавляли наночастицы с SiO_2 оболочкой, значительно снижалась относительно контроля (лунки с клетками, к которым не добавляли никаких наночастиц), достигая 35 %.

Был проведен обширный обзор научных публикаций на данную тему, по результатам которого выдвинута гипотеза, потенциально объясняющая наблюдаемый эффект. Для ее подтверждения приготовили блоки из эпоксидной смолы с клетками, инкубированными с наночастицами. Срезы данных блоков изучили методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Выяснилось, что частицы без жесткой оболочки из оксида кремния в везикулах клеток агрегировали значительно более плотно. Расчет в компьютерной модели показал, что более плотная агрегация наночастиц способствует уменьшению кинетической энергии агрегатов в условиях воздействия магнитного поля. То есть частицы с оболочкой из оксида кремния сильнее воздействовали на клетки вследствие их менее плотной агрегации.

Таким образом, в работе было установлено, что наночастицы, имеющие очень схожие магнитные свойства, могут проявлять различные биологические свойства в магнитном поле. Было предложено объяснение наблюдаемого эффекта.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ УДАРНЫХ ВОЛН НА МИКРООРГАНИЗМЫ В РАСТВОРАХ С СЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ *

SHOCK WAVES ACTION TO MICROORGANISMS IN SOLUTIONS WITH SENSITIZERS

А. Т. Ишемгулов, С. Н. Летута, С. Н. Пашкевич

Оренбургский государственный университет

A. T. Ishemgulov, S. N. Letuta, S. N. Pashkevich

Orenburg State University

E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Аннотация

Изучались особенности инактивации планктонных бактериальных культур лазерными импульсами в растворах с молекулярными сенсбилизаторами (эритрозин и родамин). Обсуждается механизм повреждения бактерий, основанный на действии ударных волн, вызванных быстрым локальным нагревом сенсбилизаторов при импульсном возбуждении.

Abstract

Inactivation of planktonic bacterial cultures by laser pulses in solutions with molecular sensitizers (erythrosine and rhodamine) was studied. Mechanism of bacterial damage is discussed based on the action of shock waves caused by the rapid local heating of sensitizers upon pulsed excitation.

Изучались особенности инактивации планктонных бактериальных культур *E.coli* и *B.subtilis* (концентрация в растворе порядка 10^8 мг⁻¹) короткими лазерными импульсами (15 нс) в растворах с молекулярными сенсбилизаторами (эритрозин и родамин, концентрация порядка 10^{-4} М). В зоне облучения возможны следующие механизмы повреждения бактерий: тепловые (прямая гипертермия), механические (действие ударных волн, генерируемых быстрой тепловой релаксацией сенсбилизаторов) и фотохимические (действие активных форм кислорода). Было установлено, что

© А. Т. Ишемгулов, С. Н. Летута, С. Н. Пашкевич, 2020

* Исследование поддержано Минобрнауки России, проект № FSGU-2020-0003.

снижение жизнеспособности бактерий, оцениваемой по КОЕ и микроскопии, наблюдается не только в зоне лазерного облучения, но и на некотором расстоянии от нее (5 и 10 мм). На таком удалении тепловые или фотохимические механизмы эффективно не действуют, поэтому было сделано предположение, что гибель бактерий возможна в результате механических повреждений, вызванных ударными волнами. Волны в растворах с сенсibilизаторами были зафиксированы по изменению рассеяния пересекающего пучка луча He-Ne-лазера. Величина наблюдаемых волн росла с увеличением плотности мощности возбуждения. Механизм генерации таких волн связан с поглощением лазерного излучения сенсibilизаторами и переводом энергии в тепло за короткое время (наносекунды), что сопровождается возникновением и схлопыванием микропузырьков в среде. С ростом энергии возбуждения увеличивается и количество выделяемого тепла. Выживаемость бактерий в зоне непосредственного облучения зависит от многих параметров (характеристики и тип бактериальной стенки, сенсibilизатора, энергия возбуждения), в то время как вне зоны облучения выживаемость зависит только от расстояния и энергии возбуждения. Полученные результаты свидетельствуют, что лазерная инактивация бактерий возможна и вне зоны непосредственного облучения, и могут быть полезны при разработке новых стратегий борьбы с микроорганизмами.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ ЗОНДАМИ ***INTERACTION OF TRIPHENYLPHOSPHONIUM DERIVATIVES OF SALICYLIC ACID WITH FLUORESCENT PROBES**

Р.А. Ишкаева, Т.И. Салихова, А. Рагад, О.В. Цепаева, Л.Р. Григорьева,
Д.В. Пономарев, А.В. Немтарев, В.Ф. Миронов, Т.И. Абдуллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет

R. A. Ishkaeva, T. I. Salikhova, A. Raghad, O. V. Tsepaeva, L. R. Grigor'eva,
D. V. Ponomaryov, A. V. Nemtarev, V. F. Mironov, T. I. Abdullin

Kazan (Volga region) Federal University

E-mail: r.a.ishkaeva@gmail.com

Аннотация

В работе исследовано взаимодействие АФК-чувствительных флуоресцентных красителей DCF и DCFDA с трифенилфосфониевыми производными (ацетил)салициловой кислоты. Показано, что взаимодействие сопровождается образованием наноразмерных агрегатов и модулирует флуоресценцию красителя в зависимости от длины алкильного линкера соединений.

Abstract

In this work, the interaction of DCF and DCFDA, ROS-sensitive fluorescent dyes, with triphenylphosphonium derivatives of (acetyl)salicylic acid was studied. The interaction was shown to result in the formation of nanosized aggregates and modulates dye fluorescence depending on the length of alkyl linker of the compounds.

Модификация биоактивных молекул трифенилфосфониевыми (ТФФ) группами является эффективным подходом к улучшению их физико-химических и фармакокинетических свойств. Объектами настоящего исследова-

© Р.А. Ишкаева, Т.И. Салихова, А. Рагад, О.В. Цепаева, Л.Р. Григорьева, Д.В. Пономарев, А.В. Немтарев, В.Ф. Миронов, Т.И. Абдуллин, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90139 и в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

ния явились ТФФ конъюгаты (ацетил)салициловой кислоты с разной длиной алкильного линкера, синтезированные в качестве потенциальных противоопухолевых средств, а также флуоресцентные красители 2',7'-дихлорфлуоресцеин (ДХФ) и его диацильное производное (ДХФДА), используемые для детектирования активных форм кислорода. Флуоресценцию красителей индуцировали в реакции фентоновского окисления пероксидом водорода в присутствии хлорида кобальта (II). Было обнаружено, что синтезированные конъюгаты ингибируют окисление/флуоресценцию красителей в диапазоне исследуемых концентраций 1–100 μM пропорционально длине алкильного линкера.

Для выяснения механизма ингибирующего эффекта охарактеризовано взаимодействие ТФФ-конъюгатов с зондами методом динамического рассеяния света. Установлено образование смешанных агрегатов, средний гидродинамический диаметр которых уменьшался приблизительно от 830 до 220 нм с удлинением линкера производных ацетилсалициловой кислоты, наряду с увеличением однородности и положительного дзета-потенциала (от +6 до +40 мВ). Результаты свидетельствуют о том, что удлинение алкильного линкера способствует образованию комплексов ТФФ-конъюгатов с ДХФДА/ДХФ, что, вероятно, может приводить к ингибированию окисления красителей. В то же время обнаружено, что наиболее липофильные ТФФ-конъюгаты ингибируют флуоресценцию предварительно окисленных красителей, по-видимому, вследствие пространственного сближения и самотушения молекул зонда. Сходный ингибирующий эффект ТФФ-конъюгатов наблюдали в отношении клеток млекопитающих, предварительно окрашенных красителями, что указывает на эффективное проникновение конъюгатов и их взаимодействие с красителем внутри клеток. Дополнительно установлено, что ТФФ-конъюгаты в определенных условиях образуют наноразмерные ассоциаты с доксорубицином, что может представлять интерес для создания противоопухолевых композиций на основе синтезированных соединений.

Литература

1. Tsepaeva O. V. et. al. Synthesis, anticancer and antibacterial activity of betulinic and betulonic acid C-28 triphenylphosphonium conjugates with variable alkyl linker length // *Anticancer Agents Med Chem*. 2020. Vol. 20(3). P. 286–300.
2. Цепаева О. В. и др. Фосфониевые соли на основе салициловой и ацетилсалициловой кислот, обладающие антибактериальной и антиоксидантной активностью. Пат. 2704025 РФ, заявитель и патентообладатель ФГБУН ФИЦ «КазНЦ РАН»; опублик.: 23.10.2019; Бюл. № 30.

ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО D/H-СОСТАВА СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА *

INFLUENCE OF THE D/H ISOTOPIC COMPOSITION OF THE MEDIUM ON THE ACTIVITY AND STRUCTURE OF HORSERADISH PEROXIDASE

С. В. Козин, А. А. Кравцов

Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону

S. V. Kozin, A. A. Kravtsov

Federal Research Centre The Southern Scientific Centre of the RAS, Rostov-on-Don

E-mail: kozinsv85@mail.ru

Аннотация

Снижение содержания дейтерия в реакционной среде приводило к уменьшению активности пероксидазной реакции окисления о-дианизидина пероксидом водорода и локальным изменениям в структуре фермента.

Abstract

A decrease in the deuterium content in the reaction medium led to a decrease in the activity of the peroxidase reaction of the oxidation of o-dianisidine with hydrogen peroxide and to local changes in the structure of the enzyme.

В природе содержание дейтерия в воде колеблется в разных регионах планеты, но в среднем находится на уровне около 150 ppm [1]. Экспериментально установлено, что даже относительно небольшое изменение изотопного состава воды существенным образом сказывается на метаболизме как микроорганизмов [2], так и высших растений и животных [3]. Целью работы было выяснение механизмов влияния низких концентраций дейтерия (50 ppm) на функциональные особенности пероксидазы хрена (ПХ) и структуру бычьего сывороточного альбумина (БСА).

При исследовании ферментативной реакции в модельной системе «о-дианизидин — ПХ — H_2O_2 » проводили линеаризацию в двойных об-

© С. В. Козин, А. А. Кравцов, 2020

* Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 19-44-233005) и государственного задания ЮНЦ РАН (№ АААА-А19-119040390083-6).

ратных координатах Лайнуивера — Берка (рис. 1). Анализ полученной экспериментальной прямой показал, что максимальная скорость реакции окисления о-дианизидина пероксидом водорода ПХ была ниже в среде, приготовленной на воде с низким содержанием дейтерия. Константа Михаэлиса, полученная в координатах Лайнуивера — Берка, для ферментативной реакции, протекающей в обедненной дейтерием среде, составила $0,033 \pm 0,003$ мМ, тогда как в среде с природным содержанием дейтерия $K_m = 0,026 \pm 0,002$ мМ.

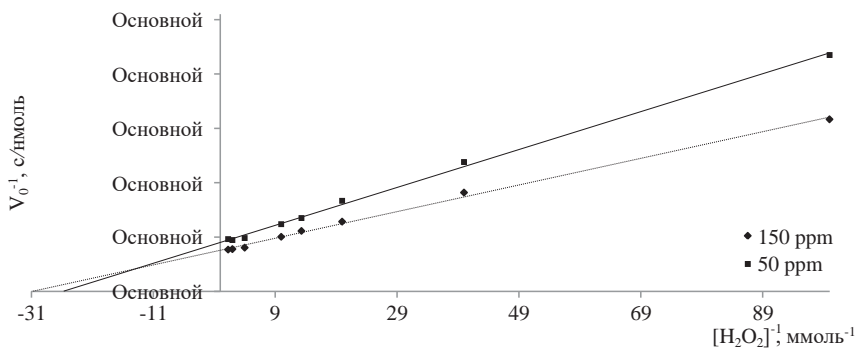


Рис. 1. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления о-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода в координатах Лайнуивера — Берка в среде с пониженным содержанием дейтерия ($pH = 7,5$)

Особенности собственной триптофановой и тирозиновой флуоресценции могут быть обусловлены тем, что количество тирозина в белке БСА составляет девятнадцать против семи в молекуле ПХ. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм интенсивность флуоресценции БСА была примерно в 2,5 раза выше, чем в ПХ. Для БСА интенсивность флуоресценции при длине возбуждения 280 и 297 нм практически не отличалась (разница не превышала 5 %). Это может означать, что основной вклад в совместную флуоресценцию БСА вносят остатки триптофана. В ПХ происходило резкое увеличение интенсивности флуоресценции при 280 нм. Таким образом, основной вклад в совместную флуоресценцию фермента вносят тирозиновые остатки. Максимум испускания для БСА составил 335 нм, а для ПХ — 310 нм. Коротковолновый максимум флуоресценции у молекулы ПХ возможно связан с гидрофобным окружением тирозиновых остатков. Среда с пониженным содержанием дейтерия не повлияла на положение максиму-

мов в спектрах опытных белков, но при этом вызвала снижение интенсивности флуоресценции (рис. 2).

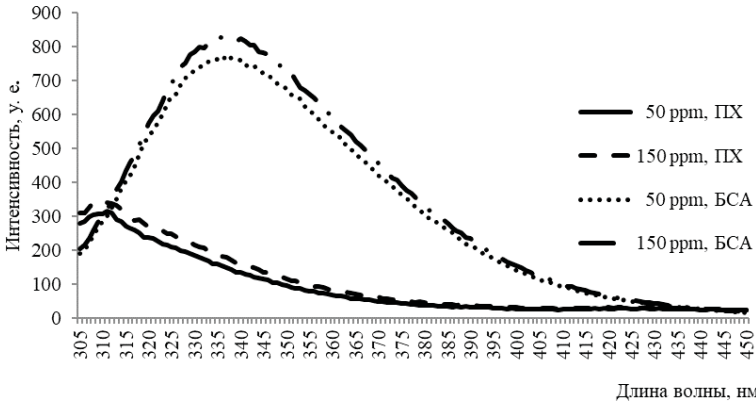


Рис. 2. Интенсивность триптофановой и тирозиновой флуоресценции (280 нм), флуоресценции БСА и ПХ в среде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm)

Исследование КД-спектров показало, что форма спектров ПХ и БСА не отличались в обеих средах, таким образом, среда с концентрацией дейтерия 50 ppm не оказала влияния на вторичную структуру обоих белков.

Литература

1. Вукон М. И., Dzhimak S. S., Basov A. A. et al. Voprosy Pitaniia. 2015. Vol. 84(4). P. 89–96.
2. Киркина А. А., Лобышев В. И., Лопина О. Д. и др. Биофизика. 2014. Vol. 59(2). P. 399–407.
3. Lobyshev V. I., Kalinichenko L. P. Isotopic effects of D_2O in biological systems. М.: Nauka, 1978.

ВЛИЯНИЕ ЭМОДИНА НА РЕАКЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

INFLUENCE OF EMODIN ON LIPID PEROXIDATION

П. А. Кононова^{1,2}, О. Ю. Селютина^{1,3}, Н. Э. Поляков^{1,3}

¹*Институт химической кинетики и горения
им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет*

³*Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск*

P. A. Kononova^{1,2}, O. Yu. Selyutina^{1,3}, N. E. Polyakov^{1,3}

¹*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

³*ISSCM SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: kononova_polina@bk.ru

Аннотация

Эмодин — хинон-хелатор растительного происхождения, способный влиять на окисление липидов. Эксперименты показали, что эмодин имеет прооксидантную активность в реакции перекисного окисления линолевой кислоты в присутствии ионов железа. В экспериментах с модельными мембранами ПОРС обнаружено, что у эмодина существенно изменяется рКа при взаимодействии с линолевой кислотой внутри бислоя.

Abstract

Emodin is a plant-derived quinone chelator capable of affecting lipid oxidation. Experiments have shown that emodin has pro-oxidant activity in the reaction of linoleic acid peroxidation in the presence of iron ions. In experiments with model membranes ПОРС, it was found that emodin significantly changes pKa when it interacts with linoleic acid inside the bilayer.

Эмодин (6-метил-1,3,8-тригидроксиантрахинон) — хелатор растительного происхождения [1]. Эмодин обладает антипролиферативной активностью, блокирует репликацию ДНК, а также усиливает генерацию свободных

радикалов. Хотя основной механизм противоракового действия эмодина — связывание с ДНК, однако существует дополнительный механизм действия хинонов-хелаторов, связанный с генерацией свободных радикалов, которые могут повреждать клеточные мембраны. Данная работа посвящена исследованию этого дополнительного фактора, связанного с влиянием хинона-хелатора на окисление ненасыщенных липидов, составляющих клеточную мембрану. Изучалось влияние эмодина на перекисное окисление линолевой кислоты в присутствии ионов железа в избытке молекулярного кислорода с помощью ЯМР-спектроскопии. Анализировались продукты и скорости реакций. Также изучалось взаимодействие эмодина с модельными мембранами РОРС (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) методами оптической и ЯМР-спектроскопии и методом молекулярной динамики [2].

Основные продукты реакции перекисного окисления в мицеллах линолевой кислоты — продукты полимеризации, в небольшом количестве присутствуют гидропероксиды и альдегиды. Присутствие эмодина приводит к появлению дополнительных продуктов. Также в присутствии эмодина возрастает наблюдаемая константа скорости реакции.

Таким образом, исследование показало, что в данных условиях эмодин демонстрирует про-оксидантную активность. В экспериментах с модельными мембранами РОРС обнаружено, что эмодин взаимодействует с линолевой кислотой внутри бислоя, при этом существенно изменяется pK_a эмодина.

Литература

1. Dong X., Fu J., Yin X. et al. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics // *Phytother. Res.* 2016. Vol. 30. P. 1207–1218. <https://doi.org/10.1002/ptr.5631>
2. Selyutina O. Yu., Kononova P. A., Polyakov N. E. Experimental and Theoretical Study of Emodin Interaction with Phospholipid Bilayer and Linoleic Acid // *Applied Magnetic Resonance.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00723-020-01233-x>

ОЦЕНКА СИЛ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ «БАКТЕРИЯ — АНТИТЕЛО» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

FORCE SPECTROSCOPY OF INTERACTIONS IN THE MODEL SYSTEM “BACTERIA — ANTIBODY” BY OPTICAL TRAPPING

И. В. Коньшев, В. С. Белозёров, Л. Г. Дудина

*Вятский государственный университет, Киров
Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар*

I. V. Konyshev, V. S. Belozyoro, L. G. Dudina

*Vyatka State University, Kirov
Institute of Physiology of the Komi Scientific Center
of the Ural Branch of the RAS, Syktyvkar*

E-mail: konyshevil@yandex.ru

Аннотация

С помощью лазерной ловушки определена сила межмолекулярного связывания клеток бактерий рода *Yersinia* двух видов с моноклональными антителами разной специфичности. Установлена значимость в оцениваемом взаимодействии O-боковых цепей липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*.

Abstract

An interaction force between *Yersinia sp.* cells (two species) and complementary or heterologous monoclonal antibodies has been evaluated by optical trapping. The significance of O-side chains of *Y. pseudotuberculosis* LPS in this interaction has been confirmed.

Yersinia pseudotuberculosis — граммотрицательная бактерия, вызывающая системное заболевание (псевдотуберкулез), протекающее в форме острого гастроэнтерита с поражением регионарных компонентов лимфатической системы. Основным структурным компонентом наружной мембраны данного возбудителя является липополисахарид (ЛПС) — один из ключевых факторов вирулентности, опосредующих начальное взаимодействие бактерий с клетками организма хозяина и дальнейшее развитие патогенеза. В по-

следние годы для изучения механизмов взаимодействия «бактерия — эукариотическая клетка» применяются современные биофизические подходы, одним из которых является метод лазерной ловушки.

Нами был разработан метод определения сил взаимодействия между бактериальными клетками и стеклянной подложкой, функционализированной моноклональными антителами (МКАт) двух типов: МКАт2, специфически взаимодействующими с О-антигеном ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, и МКАт7, связывающимися с белковым эпитопом наружной мембраны иерсиний. В качестве отрицательного контроля использовали стекла, обработанные бычьим сывороточным альбумином (БСА). Факт сенсibilизации стекла использованными препаратами МКАт был подтвержден иммунохимически. Клетки *Y. pseudotuberculosis* O1b, несущие О-антиген, и клетки *Y. pestis* EV, на поверхности которых он отсутствует, сближали с подложками с помощью аксиальной лазерной ловушки, после чего оценивали силу разрыва связи в каждой системе.

Среднее значение сил отрыва клеток *Y. pseudotuberculosis* O1b от стекла, функционализированного препаратом МКАт2 ($5,86 \pm 3,31$ пН), оказалось существенно ($p > 0,99$) выше по сравнению со стеклами, покрытыми МКАт7 ($2,00 \pm 1,77$ пН) и БСА ($1,97 \pm 1,33$ пН).

Иная картина наблюдалась при сравнении взаимодействующих объектов на основе клеток *Y. pestis* EV: сила отрыва клеток от стеклянной подложки, функционализированной МКАт7 ($9,60 \pm 4,86$ пН), напротив, оказалась достоверно ($p > 0,99$) выше сравнительно с иммобилизованными на стекле МКАт2 ($4,20 \pm 2,93$ пН) и BSA ($4,62 \pm 5,16$ пН).

Совокупность представленных данных однозначно указывает на наличие выраженной специфической составляющей в исследуемых взаимодействиях. Так, клетки психрофильного возбудителя *Y. pseudotuberculosis* O1b при низких температурах культивирования продуцируют полную форму ЛПС, включающего О-боковые цепи, и поэтому достаточно прочно связываются с МКАт2. Клетки *Y. pestis* EV, лишенные О-боковых цепей, несут белковый эпитоп, специфически распознаваемый антителами МКАт7.

**ИЗУЧЕНИЕ СКОРОСТИ СОЗРЕВАНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО
КОМПОНЕНТА ЭМАЛИ ЗУБОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ НАРУШЕННОМ
АМЕЛОГЕНЕЗЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ***

**STUDYING THE RATE OF MATURING OF THE MINERAL COMPONENT
OF HUMAN TEETH ENAMEL IN DISTURBED AMELOGENESIS
BY ATOMIC POWER MICROSCOPY**

А. С. Коршунов ¹, В. П. Конев ¹, В. Д. Вагнер ², К. Н. Курятников ¹

¹ Омский государственный медицинский университет

² Национальный медицинский исследовательский центр стоматологии
и челюстно-лицевой хирургии, Москва

A. S. Korshunov ¹, V. P. Konev ¹, V. D. Vagner ², K. N. Kuryatnikov ¹

¹ Omsk State Medical University

² CRIDMFS, Moscow

E-mail: Andrey_K_180588@mail.ru

Аннотация

Установлено, что одинаковые по скорости темпы роста в длину и ширину эмалевых призм при нарушенном амелогенезе до 30 лет приводят к неправильным их пропорциям и ухудшают качество эмали.

Abstract

It has been established that the same growth rates in length and width of enamel prisms with impaired amelogenesis up to 30 years, lead to their incorrect proportions and worsen the quality of enamel.

Мутации в генах вызывают нарушение процесса амелогенеза с формированием фенотипов незрелой эмали зубов человека [1, 2].

© А. С. Коршунов, В. П. Конев, В. Д. Вагнер, К. Н. Курятников, 2020

* Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А18-118011190073-0 и при поддержке фонда «УМНИК» (договор № 15815ГУ/2020).

Цель исследования

Изучить размеры эмалевых призм в различные периоды постнатального онтогенеза при нарушенном амелогенезе методом атомно-силовой микроскопии.

Материал и методы

Анализировали длину и ширину эмалевых призм в программе Image Analysis NT-VDT при нарушенном амелогенезе (НА) по методике ОмГМУ (Патент РФ № 2458675 от 20.08.2012, патент РФ № 2702903 от 14.10.2019).

Результаты

При НА самый быстрый темп роста эмалевых призм наблюдается в направлении, увеличивающем длину призмы (15–20 лет — $5,04 \pm 0,21$ нм., 21–30 лет — $6,23 \pm 0,14$ нм.), однако темп роста на плоскости, увеличивающий ширину призмы (15–20 лет — $4,32 \pm 0,12$ нм., 21–30 лет — $4,45 \pm 0,21$ нм., 31–40 лет — $4,86 \pm 0,25$ нм., 41–50 лет — $5,22 \pm 0,11$ нм., 51–60 лет — $5,21 \pm 0,27$ нм.), является очень схожим с темпом роста длины, что приводит к неправильному изменению формы эмалевых призм.

Выводы

При нарушенном амелогенезе в процессе созревания эмалевые призмы приобретают неправильную форму.

Литература

1. Конев В. П., Вагнер В. Д., Коршунов А. С., Серов Д. О. Особенности созревания минерального компонента эмали ретинированных зубов при дисплазии соединительной ткани // Институт стоматологии. 2019. Т. 84, № 3. С. 102–103.
2. Varki R., Sadowski S., Pfendner E., Uitto J. Epidermolysis bullosa // I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants. 2010 P. 31–32.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ЛИПИДОВ С УЧАСТИЕМ
ХЕЛАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ТИОСЕМИКАРБАЗОНОВ *

THE STUDY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES INVOLVING
CHELATE COMPLEXES OF THIOSEMICARBAZONES

В. Е. Кошман^{1,2}, О. Ю. Селютина^{1,3}, В. А. Тимошников¹, Н. Э. Поляков^{1,3}

¹Институт химической кинетики и горения
им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

³Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Россия

V. E. Koshman^{1,2}, O. Yu. Selyutina^{1,3}, V. A. Timoshnikov¹, N. E. Polyakov^{1,3}

¹Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

³ISSCM SB RAS, Novosibirsk

E-mail: kosmanvova2010@mail.ru

Аннотация

Тиосемикарбазоны (ТСК) вызывают повышенный интерес ученых из различных областей науки благодаря широкому спектру их химической и биологической активности. Их противораковую активность всегда связывали со способностью ингибировать рибонуклеотид редуктазу. Однако последние исследования указывают на большую роль окислительного стресса в противоопухолевой активности ТСК. В данной работе на примере тиосемикарбазона Dp44mT изучались процессы перекисного окисления липидов с участием хелатных комплексов с ионами железа и меди. Взаимодействие хелатных комплексов Dp44mT с липидным бислоем и их роль в реакции перекисного окисления липидов исследовалось на модельных системах методами импульсного ЯМР.

Abstract

Thiosemicarbazones (TSC) are of great interest to scientists from various fields of science, due to the wide range of their chemical and biological activity. Their anticancer activity has always been associated with the ability to inhibit ribonucleotide reductase. However,

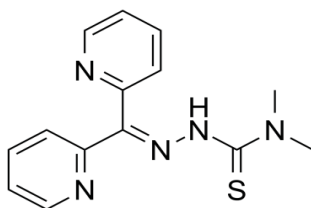
© В. Е. Кошман, О. Ю. Селютина, В. А. Тимошников, Н. Э. Поляков, 2020

* Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 20-33-70019.

recent studies indicate a major role of oxidative stress in the antitumor activity of TSC. In this work, using the example of thiosemicarbazone Dp44mT, the processes of lipid peroxidation with the participation of chelate complexes with iron and copper ions were studied. The interaction of Dp44mT chelate complexes with the lipid bilayer and their role in the reaction of lipid peroxidation was studied on model systems by pulsed NMR methods.

Хелатные комплексы тиосемикарбазонов перспективны как потенциальные противораковые агенты, активность которых связана со способностью ингибировать рибонуклеотидредуктазу. Однако недавние исследования указывают на важную роль окислительного стресса в противоопухолевой активности тиосемикарбазонов [1]. Этот аспект их биологической активности в настоящее время очень мало изучен и представляет большой интерес для медицинской химии.

В данной работе изучались процессы перекисного окисления липидов с участием хелатных комплексов тиосемикарбазона с ионами металлов. В качестве хелатора выступает соединение Dp44mT (см. рисунок).



Структура тиосемикарбазона Dp44mT

Проводились эксперименты в модельных системах (липосомах и бицеллах). Методами ЯМР и оптической спектроскопии изучались окислительно-восстановительные свойства комплексов Dp44mT с железом и медью в реакции перекисного окисления липидов. Также было изучено взаимодействие комплексов Dp44mT с липидной мембраной.

Литература

1. Richardson D. R., Kalinowski D. S., Richardson V. et al. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones are Potent Iron Chelators and Antiproliferative Agents: Redox Activity, Iron Complexation and Characterization of their Antitumor Activity // J. Med. Chem. 2009. Vol. 52. P. 1459–1470.

ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА РАННИХ СТАДИЯХ *

REVELATION OF PROTEOMIC INDICATORS FOR COLORECTAL CANCER IN INITIAL STAGES OF DEVELOPMENT

К. А. Мальсагова

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
им. В. Н. Ореховича, Москва*

K. A. Malsagova

IBMС, Moscow

E-mail: malsagova.ka@gmail.com

Аннотация

На сегодняшний день колоректальный рак (КР) является наиболее опасной онкопатологией с высоким уровнем инвалидизации и смертности в популяции. На ранних стадиях развития, когда симптомы отсутствуют, но эффективность терапии высока, КР практически не диагностируется. Поиск надежных белковых маркеров для ранней диагностики чрезвычайно важная научно-практическая задача. Анализ посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков, сопровождающих развитие онкопатологии, также может значительно повысить качество и уровень диагностики КР. В данной работе был проведен сравнительный протеомный анализ образцов плазмы крови, полученных от 41 здорового добровольца и 28 пациентов с КР на разных стадиях развития заболевания. Основной задачей исследования являлось определение изменения содержания белков, возможных модификаций белков, которые вероятно ассоциированы с развитием КР на ранних стадиях развития.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) at a current clinical level is still hardly diagnosed, especially with regard to nascent tumors, which are typically asymptomatic. Searching for reliable biomarkers of early diagnosis is an extremely essential task. Identification of specific post-translational modifications (PTM) may also significantly improve net benefits and tailor the process of CRC recognition. We examined depleted plasma samples obtained from 41 healthy volunteers and 28 patients with CRC at different stages to conduct comparative

proteome-scaled analysis. The main goal of the study was to establish a constellation of protein markers in combination with their PTMs and semi-quantitative ratios that may support and realize the distinction of CRC until the disease has a poor clinical manifestation.

По результатам протеомного анализа было определено 119 и 166 белков у пациентов с диагнозом КР I–II и III–IV стадий соответственно. Большая группа белков (44 белка) отвечает за развитие иммунного ответа, метаболизма липидов и ответа на стресс. Содержание части белков было значимо ($p < 0,01$) для I–II стадий КР [1]. Среди белков, специфичных I–II стадии КР, наиболее заметными являлись цитокины (кластерин, С4b-связывающий белок, гликопротеин CD59 и др.), белки лектинового пути. Наблюдались значительные изменения уровня содержания в образцах крови белков интер-альфа-трипсина (ITIN1, ITIN2, ITIN3 и ITIN4), что, вероятно, связано с их влиянием на развитие злокачественного процесса. Было обнаружено, что значимо изменяется при КР содержание в крови альфа-1-кислотного гликопротеина 2, альфа-1В-гликопротеина, гаптоглобина и богатого лейцином альфа-2-гликопротеином, участие которых в развитии онкопатологии пока не изучено. Кроме того, были выявлены ПТМ белков, которые, согласно литературным данным, связаны с развитием КР, включая фосфорилирование кининогена 1, альфа-2-НС-гликопротеина, ацетилирование витамина D-связывающего белка и ингибитора протеазы С1 плазмы, которые также могут участвовать в ответе организма на опухолеобразование [2]. В результате исследования было показано, что вклад цитокинов и белков внеклеточного матрикса является наиболее значимыми факторами в развитии КР на ранних стадиях. Возможно, это обусловлено тем, что рост опухоли тесно связан с хроническим асептическим воспалением, потерей стабильности внеклеточного матрикса. Белки аполипопротеин Е, С1 и В-100 участвуют в процессах репарации ДНК и регуляции пути mTOR и PI3K.

Литература

1. Kopylov A. T. et al. Revelation of Proteomic Indicators for Colorectal Cancer in Initial Stages of Development // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 619. P. 1–20.2. Tikhonov D. et al. Super Secondary Structures of Proteins with Post-Translational Modifications in Colon Cancer // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 3144. P. 1–17.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ НИФЕДИПИНА С ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

THE STUDY OF THE COMPLEXATION OF NIFEDIPINE WITH GLYCYRRHIZIC ACID

А. В. Мастова^{1,2}, О. Ю. Селютина^{1,3}, Н. Э. Поляков^{1,3}

¹*Институт химической кинетики и горения
им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет*

³*Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск*

A. V. Mastova^{1,2}, O. Yu. Selyutina^{1,3}, N. E. Polyakov^{1,3}

¹*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

³*ISSCM SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: mastova-anna99@yandex.ru

Аннотация

Глицирризиновая кислота (ГК) — тритерпеновый гликозид растительного происхождения, известный своей высокой и разнообразной биологической активностью (противовоспалительной, противоязвенной, антиаллергической, противовирусной, противоопухолевой и др.). Кроме того, ГК способна образовывать самоассоциаты и комплексы с лекарственными средствами, что приводит к снижению токсичности и усилению терапевтического действия лекарственных препаратов, что делает ее перспективным агентом для доставки лекарств. В предыдущих работах на примере комплексообразования ГК с нифедипином и лаппаконитином было показано значительное увеличение терапевтической активности на моделях адреналин-индуцированной гипертензии и индуцированной CaCl_2 аритмии [1]. В данной работе будет рассмотрено влияние концентрации ГК и pH раствора на комплексообразование с нифедипином.

Abstract

Glycyrrhizic acid (GA) is a plant-derived triterpene glycoside, known for its high and diverse biological activity (anti-inflammatory, anti-ulcer, anti-allergic, antiviral, antitumor, etc.). In addition, GA is able to form self-associations and complexes with drugs, which

leads to reducing toxicity and increasing of the therapeutic effect of drugs, which makes it a promising agent for drug delivery. In previous studies, a significant increase in therapeutic activity was shown on the models of adrenaline-induced hypertension and CaCl₂ induced arrhythmia using the example of GA complexation with nifedipine and lappaconitine [1]. In this study, we will consider the dependence of the concentration of GA and pH of the solution on complexation with nifedipine.

Глицирризиновая кислота — тритерпеновый гликозид из экстракта корня солодки. Благодаря широкому спектру биологической активности и способности к самоассоциации и комплексообразованию с различными гидрофобными молекулами лекарств, ГК является перспективным агентом для доставки лекарственных препаратов [2]. Известно, что процесс самоассоциации ГК сильно зависит от pH раствора. ГК имеет три кислотных группы, с константами диссоциации: $pK_{a_1} = 3,98$, $pK_{a_2} = 4,62$, $pK_{a_3} = 5,17$. При депротонировании существенно изменяется критическая концентрация мицеллообразования ГК. Можно предположить, что степень диссоциации ГК будет влиять также и на ее комплексообразование с лекарственными препаратами.

Данное предположение было проверено методами оптической и ЯМР-спектроскопии. Были изучены образцы с различными значениями pH раствора: 3,8; 4,2; 5,0; 6,1, что соответствует протонированной, частично депротонированной и полностью депротонированной форме ГК. Были получены зависимости оптической плотности растворов нифедипина от концентрации ГК и проанализированы их ЯМР-спектры. Также методом ЯМР были измерены коэффициенты диффузии для комплексов нифедипина с ГК при этих значениях pH. Было обнаружено, что происходит нелинейное изменение коэффициента диффузии комплексов в зависимости от pH, что может означать изменение структуры комплексов при частичной и полной диссоциации ГК.

Литература

1. Polyakov N. E., Khan V. K., Taraban M. B., Leshina T. V. Complex of Calcium Receptor Blocker Nifedipine with Glycyrrhizic Acid // J. Phys. Chem. B. 2008. Vol. 112. P. 4435–4440.
2. Selyutina O. Yu., Polyakov N. E. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier — from physicochemical properties to biomedical applications: a modern insight on the ancient drug // Int. J. Pharm. 2019. Vol. 559. P. 271–279.

**КОНТРАСТНЫЕ АГЕНТЫ НА ОСНОВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И НИТРОКСИДОВ ДЛЯ
МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ***

CONJUGATES OF NITROXIDES AND HUMAN SERUM ALBUMIN
AS CONTRAST AGENTS FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING

Д. Е. Митин, Д. А. Суворов, К. А. Клочихин, А. С. Чубаров

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

D. E. Mitin, D. A. Suvorov, K. A. Klochihin, A. S. Chubarov

*ICBFM SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

E-mail: chubarovalesha@mail.ru

Аннотация

Работа направлена на получение и исследование свойств конъюгатов человеческого сывороточного альбумина с новыми стерически затрудненными нитроксильными радикалами. Проведен ряд экспериментов по оценке возможности использования полученных конъюгатов в качестве контрастных агентов для МРТ.

Abstract

The work is aimed at obtaining and studying the properties of Human serum albumin conjugates with new sterically-hindered nitroxides. A number of experiments to evaluate the possibility of using the conjugates as contrast agents for MRI were done.

Among the many imaging modalities for medical diagnostics, magnetic resonance imaging (MRI) is one of the most useful thanks to its ability to noninvasively generate three-dimensional detailed anatomical images with high spatial reso-

© Д. Е. Митин, Д. А. Суворов, К. А. Клочихин, А. С. Чубаров, 2020

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-13-00235 и совместной программы «Михаил Ломоносов» Минобрнауки РФ и DAAD.

lution. Current clinical MRI methods depict the spatial distribution and chemical environment of water protons. To enhance the differences between native water ^1H and a region of interests, contrast agents are often employed. Despite their unquestionable utility, metal-based contrast agents may present toxicity concerns. Thus, there is extensive interest in the development of “metal-free” MRI contrast agents that make use of entirely organic-based components. Based on the previous work and experience, in this proposal we would like to produce MRI probes using another non-metal MRI contrast agents — nitroxide-based organic radicals.

Human serum albumin (HSA) could be used as an attractive candidate for the development of drug delivery systems due to its enhanced uptake in tumor tissue, biodegradability, stability etc. The main aim of the project is to develop convenient and efficient methods for synthesis of modified HSA protein with variable amount of different types of sterically shielded nitroxyl radicals [1].

Four albumin-nitroxide conjugates were prepared and tested as metal-free organic radical contrast agents for MRI. Each HSA bears 4-5 nitroxides conjugated via homocysteine thiolactone moieties. The conjugates were characterized by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), MALDI ToF MS and circular dichroism spectroscopy. These molecular conjugates retain important physical and biological properties of HSA component, and the resistance of their nitroxide groups to bioreduction was enhanced. Initial tests of biocompatibility checked for the formation of potentially toxic aggregates using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and MTT test for cytotoxicity. The relaxivities r_1 and r_2 are similar for these four conjugates and are much greater than those of their individual components. ^1H -MRI phantom images *in vitro* were obtained.

Литература

1. Dobrynin S., Kutseikin S., Morozov D. et al. Human Serum Albumin Labelled with Sterically-Hindered Nitroxides as Potential MRI Contrast Agents // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 1709.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ СПЕКЛ-ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

STUDYING OF LIVING CELLS BY DYNAMIC SPECKLE-INTERFEROMETRY METHOD

Ю. А. Михайленко¹, А. П. Владимиров^{1,2}, А. А. Бахарев¹

¹Екатеринбургский научно-исследовательский институт
вирусных инфекций «Вектор»,

²Уральский федеральный университет им. первого Президента России
Б.Н. Ельцина, Екатеринбург

Yu. A. Mikhaylenko¹, A. P. Vladimirov^{1,2}, A. A. Bakharev¹

¹ERIVI, FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Ekaterinburg

²Ural Federal University, Ekaterinburg

E-mail: mikhaylova_ya@eniivi.ru

Аннотация

Целью доклада является ознакомление с выявленными закономерностями исследования неразрушающим методом динамической спекл-интерферометрии живых клеток Л-41 и RD при различных внешних воздействиях (изменение температуры окружающей среды, действие двух типов вирусов) и при разморозке клеток.

Abstract

The report aim is to familiarize with the revealed regularities of studying living L41 and RD cells by the non-destructive dynamic speckle interferometry method under various external influences (environment temperature changes, the exposure to two types of viruses) and during cell defrosting.

При освещении прозрачного объекта через матовое стекло когерентным излучением в плоскости изображения объекта образуется в макроскопическом смысле однородная, но в микроскопическом смысле — неоднородная структура рассеянного излучения, которая представляет из себя спеклы случайного размера и яркости. Спеклы (в переводе с англ. *speckle* — пятно) являются результатом интерференции многих когерентных волн со случайными

амплитудами и фазами. В результате перемещения объекта, изменения его формы, протекания микроскопических процессов, локально изменяющих высоту рельефа поверхности или показатель преломления среды вблизи поверхности, спекл-картина будет меняться — наблюдается динамика спеклов.

Актуальной задачей является выявление связи между параметрами, характеризующими процессы в биологических объектах, вызывающие случайные изменения амплитуд и фаз волн, с характеристиками динамики спеклов. В работе [1] для тонкого прозрачного объекта представлена теория и методика, позволяющие по спекловым изображениям изучать изменения средних значений, дисперсии и времена релаксации разности оптических путей волн, проходящих через объект.

Целью настоящей работы было установление закономерностей изменения сигналов динамики спеклов в пространстве и во времени в плоскости изображения монослоя культивированных на стеклянной подложке и размороженных клеток при больших оптических увеличениях и различных внешних воздействиях (изменение температуры окружающей среды, действие вируса).

Объектом исследования являлся монослой клеток культур Л-41 КД/84, RD — интактных и зараженных вирусами герпеса первого типа и энтеровируса ЕСНО11.

Для записи спекловых картин в качестве источника света использован полупроводниковый лазерный модуль с длиной волны $\lambda = 650$ нм, 532 нм и мощностью 20 мВт. Излучение от модуля попадало на матовый рассеиватель, далее на кювету с объектом исследования. В опытах использовалась монохромная телекамера типа Видеоскан — 415/П/К-USB с матрицей фотоприемников размером $6,5 \times 4,8$ мм, содержащую 780×582 ячеек размером $8,3 \times 8,3$ мкм. Частота ввода кадров — до 25 Гц. Время экспонирования телекамеры составляло 9 с. Запись кадров — картин спеклов — осуществлялась в течение времени до 24 часов.

Исследуемым параметром являлся коэффициент корреляции η фрагмента цифрового спеклового изображения, зарегистрированного в начальный и текущий моменты времени:

$$\eta = \frac{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [A_{i,j} - \bar{A}][B_{i,j} - \bar{B}]}{\sqrt{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [A_{i,j} - \bar{A}]^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [B_{i,j} - \bar{B}]^2}} \quad (1)$$

где $A_{i,j}$ — цифровое значение интенсивности I на участке размером $m \times n$ пикселей в начальный момент времени, $B_{i,j}$ — цифровое значение интенсив-

ности I на этом же участке через время τ_{ij} , i, j — номера пикселей участков в направлении осей x и y соответственно, A — средняя величина цифрового значения интенсивности I на участке в начальный момент времени, B — средняя величина цифрового значения интенсивности I на участке через время τ .

В докладе отражены результаты изучения неразрушающим методом динамической спекл-интерферометрии реакции клеток при изменении температуры окружающей среды от 26°C до 37°C с разной скоростью, установлены закономерности при исследовании размороженных клеток указанным методом, предложен диапазон температур для исследования процессов в живых клетках, проведено сравнение результатов воздействия на клетки вирусами ЕСНО11 и герпеса первого типа.

Литература

1. Владимиров А. П. Динамическая спекл-интерферометрия микроскопических процессов, протекающих в тонких биологических объектах // Известия вузов. Радиоп физика. 2014. Т. 57, № 8–9. С. 632–645.

**ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ АРИТМОГЕННОСТИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ
ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВОГО ДОНОРА ***

DRUGS ARRHYTHMOGENICITY TEST VALIDATION USING HUMAN
CARDIOMYOCYTES DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT
STEM CELLS OF A HEALTHY DONOR

А. Д. Подгурская, М. М. Слотвицкий, В. А. Цвеляя,
Ш. Р. Фролова, С. Г. Романова, К. И. Агладзе

Московский физико-технический институт

A. D. Podgurskaya, M. M. Slotvitsky, V. A. Tselaya, S. R. Frolova,
S. G. Romanova, K. I. Agladze

Moscow Institute of Physics and Technology

E-mail: alisapodgurskaya@mail.ru

Аннотация

Валидирован тест на аритмогенность *in vitro* (формирование ре-ентри на стандартном линейном препятствии) при применении циклофосфамида (ЦФ). Отсутствие ре-ентри обнаружено в диапазоне концентраций 213–852 μM ЦФ. Максимальная усваиваемая частота снизилась до $25 \pm 7\%$. После обработки ЦФ не менялся уровень распределения коннексина 43, получено зависящее от времени разрушение α -актинина.

Abstract

The arrhythmogenicity test *in vitro* (re-entry formation on a standard linear obstacle) was validated when using cyclophosphamide (CP). The absence of reentry was found in the concentration range of 213–852 μM CP. The maximum capture rate dropped up to $25 \pm 7\%$. After CP treatment, the distribution level of connexin 43 did not change, and a time-dependent degradation of α -actinin was obtained.

© А. Д. Подгурская, М. М. Слотвицкий, В. А. Цвеляя, Ш. Р. Фролова, С. Г. Романова, К. И. Агладзе, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90113.

Ранее авторами был разработан экспериментальный метод оценки кардиотоксичности с применением монослоев кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов. Он заключается в оценке вероятности возникновения спиральных волн (ре-ентри) под воздействием вещества, необходимого и достаточного условия для возникновения аритмий, методом оптического картирования. Данный метод определения аритмогенности веществ изначально разрабатывался с использованием блокатора E-4031 и лидокаина [1], был проверен в двух модельных системах: монослое кардиомиоцитов, полученных из ИПСК здорового донора, и в монослое неонатальных крысиных кардиомиоцитов — с использованием антибиотика эритромицина [2]. Тестирование вещества циклофосамида (ЦФ), опосредованно действующего на потенциал-зависимые ионные каналы, позволило раскрыть механизмы возникновения аритмий при воздействии на сердце и валидировать данное тестирование на аритмогенность.

Получены результаты по влиянию ЦФ на скорость проводимости и максимальную усваиваемую частоту (МУЧ) в монослое пациент-специфичных человеческих кардиомиоцитов, полученных из ИПСК здорового донора, проведено тестирование на аритмогенность *in vitro*, изучено влияние ЦФ на цитоскелет кардиомиоцитов. В клинике вещество является аритмогенным, механизм возникновения аритмий *in vitro* при воздействии ЦФ в малых дозах (до 100 мг/кг) мало изучен. В диапазоне действующих на монослой концентраций 213–852 μM ЦФ (~4–18 мг/кг) получены дозозависимости СП и МУЧ, было выявлено снижение МУЧ до $25 \pm 7\%$ при наибольшей действующей концентрации ЦФ. В результате тестирования на аритмогенность *in vitro* вероятность возникновения ре-ентри на стандартном линейном препятствии под воздействием ЦФ была нулевой. Данный результат согласуется с ранее полученными данными [1, 2].

Снижение МУЧ может быть вызвано нарушением функционирования ионных каналов и/или межклеточных контактов либо повреждением целостности клеточных структур. Ранее авторами влияния ЦФ на ионные каналы выявлено не было. После воздействия ЦФ уровень распределения щелевых контактов — коннексина-43 в монослое кардиомиоцитов — оставался неизменным. Зависящее от времени разрушение α -актинина было обнаружено и свидетельствовало о влиянии ЦФ на структуру кардиомиоцитов. В дальнейшем данный тест может применяться для изучения эффектов веществ на сердечной ткани, полученной из ИПСК пациентов с распространенными генетическими мутациями, а именно каналопатиями.

Литература

1. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity Test Based on a Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cardiomyocyte Layer // *Toxicol. Sci.* Oxford University Press. 2019. Vol. 168, № 1. P.70–77.
2. Podgurskaya A. D. et al. The Use of iPSC-Derived Cardiomyocytes and Optical Mapping for Erythromycin Arrhythmogenicity Testing // *Cardiovasc. Toxicol.* 2019.

ВЛИЯНИЕ ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ТРАНСПОРТА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЛЕЙКОЦИТЫ НА АКТИВАЦИЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

EFFECT OF PHOTOINDUCED ASCORBIC ACID TRANSPORT IN NEUTROPHILIC LEUKOCYTES ON MYELOPEROXIDASE ACTIVATION

А. А. Птицын, Л. Т. Рязанцева, В. П. Октябрьский

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

A. A. Ptitsyn, L. T. Ryazantseva, V. P. Oktyabrskiy

Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University

E-mail: android.android.1980@mail.ru

Аннотация

В данном исследовании показан фотоиндуцированный транспорт аскорбиновой кислоты в нейтрофильные лейкоциты в присутствии фотосенсибилизатора. Обсуждается роль витамина в фотоактивации миелопероксидазы в условиях лазерного облучения крови человека.

Abstract

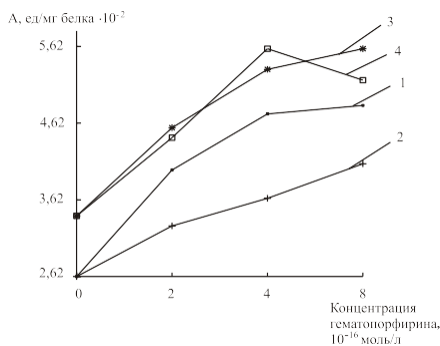
This study shows the photoinduced transport of ascorbic acid to neutrophilic white blood cells in the presence of a photosensitizer. The role of vitamin in the photoactivation of myeloperoxidase under laser irradiation of human blood is discussed.

В настоящее время известно, что лазерное облучение крови (ЭЛОК) индуцирует повышение активности миелопероксидазы (МПО), обладающей бактерицидными свойствами и функцией разрушения эндогенного пероксида водорода. Поскольку в системе крови присутствуют различные низкомолекулярные антиоксиданты (АО), которые должны отчасти нивелировать действие активных форм кислорода, образующихся при лазерном облучении (ЛО) крови, то для вскрытия молекулярных механизмов действия ЛО крови на активность МПО корректнее рассматривать процессы, протекающие при облучении нейтрофильных лейкоцитов в присутствии АО.

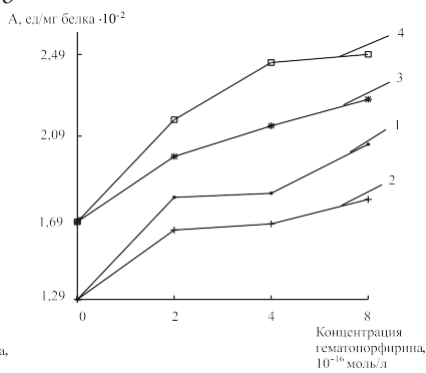
В настоящей работе в качестве антиоксиданта использовали аскорбиновую кислоту (АК), являющуюся необходимым компонентом всех тканей и клеток живых организмов, где она в нормальной физиологической концентрации (в плазме — $7,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) поддерживает на низком стационарном уровне свободнорадикальные автоокислительные процессы. Эксперименты проводили на модельных системах с использованием в качестве фотосенсибилизатора экзогенного гематопорфирина (полоса Core с $\lambda_{\max} = 387$ нм ($\epsilon = 48 \cdot 10^3$ M⁻¹cm⁻¹)), который получали из гемоглобина человека. Для облучения использовали твердотельный лазер на монокристалле алюмината иттрия, легированного неодитом, AI:Nd³⁺ ($\lambda = 540$ нм).

Было обнаружено, что при облучении клеток в присутствии гематопорфирина (ГП) в концентрациях $2 \cdot 10^{-16}$, $4 \cdot 10^{-16}$ и $8 \cdot 10^{-16}$ моль/л наблюдается уменьшение содержания АК в экстрацеллюлярном пространстве на 25, 27 и 35 % соответственно. Это позволяет говорить о фотоиндуцированном транспорте витамина в нейтрофильные лейкоциты в результате пероксидного окисления липидов мембран в присутствии ГП. Увеличение концентрации витамина в клетке приводит к изменению функциональных свойств МПО: МПО-активность нейтрофильных лейкоцитов в присутствии АК ($7,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) выше таковой в суспензии клеток без АО на 30 % при pH 6,0 (см. рисунок, а).

а



б



Активность МПО облученной системы Нф-ГП: 1,3 — в присутствии и 2,4 — после удаления ГП; 3,4 — в присутствии аскорбиновой кислоты; pH реакционной смеси: а) 6,0 и б) 7,4; доза облучения — 0,6 Дж/см²

При pH 7,4 степень активации МПО в системе Нф-ГП-АК после удаления несвязанного модификатора выше (см. рисунок, кривая 4) исследу-

емого параметра в присутствии ГП в растворе (см. рисунок, *кривая 3*); так, при концентрации модификатора $4 \cdot 10^{-16}$ моль/л в анализируемой системе МПО-активность облученной суспензии после исключения ГП из раствора достоверно повышается на 19 %. Этот факт свидетельствует в пользу того, что АК исключает участие свободных молекул ГП в реакциях, приводящих к изменению МПО-активности нейтрофилов. Методом хемиллюминесценции было установлено, что смесь АК с ГП в используемых концентрациях не генерирует активные формы кислорода, таким образом, витамин проявляет только антиоксидантные свойства, защищая компоненты системы от действия сенсibilизатора.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА С ПОВЕРХНОСТЬЮ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ *****INTERACTION BETWEEN PLASMINOGEN
AND MODIFIED MAGNETIC NANOPARTICLES**

Э. З. Садыкова¹, Е. А. Костанова¹,
М. И. Бирюкова¹, А. Г. Мурадова², А. В. Бычкова¹

¹Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева,
Москва

E. Sadykova¹, E. Kostanova¹, M. Biryukova¹, A. Muradova², A. Bychkova¹

¹IBCF RAS, Moscow

²D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

E-mail: sadykova.leonora@gmail.com, anna.v.bychkova@gmail.com

Аннотация

Исследовано взаимодействие плазминогена — белка фибринолитической системы — с поверхностью частиц, ядром которых являются магнитные наночастицы оксидов железа, модифицированных оксидом кремния и аминогруппами или сывороточным альбумином человека (ЧСА), и десорбция плазминогена с поверхности частиц. Проведена оценка фибринолитической активности плазминогена на поверхности частиц. Подтверждена возможность неоднократного использования частиц для сорбции плазминогена.

Abstract

The work includes the synthesis of particles consisting of the magnetic iron oxide core modified with silicon dioxide and amino groups, as well as modified with human serum albumin (HSA), and the study of the adsorption of plasminogen on the particles surface, the study of desorption of plasminogen from the particles and the study of fibrinolytic activity of plasminogen on the particles surface. The possibility of repeated use of particles for sorption of plasminogen has also been confirmed.

© Э. З. Садыкова, Е. А. Костанова, М. И. Бирюкова, А. Г. Мурадова, А. В. Бычкова, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ, проект № 18-73-00350.

В последнее десятилетие в связи с интенсивным развитием приборных количественных методов анализа крови больных в острых патологических состояниях или при развитии хронических заболеваний требуется проведение быстрых процедур по извлечению из крови белковых маркеров-аналитов. Одним из таких маркеров может являться пламиноген — белок-предшественник пламина, играющего главную роль в фибринолитической системе. Цель настоящей работы — исследование взаимодействия пламиногена с поверхностью магнитных частиц, модифицированных диоксидом кремния и аминоклуппами [1], и частиц, модифицированных человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) [2]. Нами доказано связывание в среднем около 0,22 и 0,33 мг пламиногена на 1 мг частиц, модифицированных диоксидом кремния и аминоклуппами, и частиц, модифицированных ЧСА соответственно. С помощью коммерчески доступных наборов определения активности пламиногена НПО «Ренам» (Россия) подтверждено сохранение до 30 % фибринолитической активности белка. На основе количественных оценок связывания и элюции пламиногена, данных о сохранении пламиногеном функциональных способностей на поверхности частиц, доказанной возможности эффективной десорбции пламиногена и повторного использования частиц, а также литературных данных о достаточной гидрофильности и инертности в биологических жидкостях частиц с аналогичными по составу покрытиями мы предполагаем возможности применения созданных нами частиц для транспорта пламиногена, а также для его извлечения из раствора. Полученные нами данные по неспецифическому связыванию пламиногена обладают высокой значимостью в связи с широким распространением в настоящее время работ по модификации поверхности магнитных частиц диоксидом кремния с различными функциональными группами, а также сывороточным альбумином, традиционно используемым для снижения неспецифической сорбции при работе с кровью и плазмой.

Литература

1. Zaytseva M. P., Muradova A. G., Sharapaev A. I. et al. Fe₃O₄/SiO₂ core shell nanostructures: preparation and characterization // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2018. Vol. 63. P. 1684–1688. doi:10.1134/S0036023618120239
2. Bychkova A. V., Rosenfeld M. A., Leonova V. B. et al. Free-radical cross-linking of serum albumin molecules on the surface of magnetite nanoparticles in aqueous dispersion // Colloid J. 2013. Vol. 75. doi:10.1134/S1061933X13010031

**НАРУШЕНИЕ ПЛАСТИЧНОСТИ СИНАПСОВ
В ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬНЫМ
СТРЕССОВЫМ РАССТРОЙСТВОМ**

**IMPAIRED SYNAPTIC PLASTICITY OF THE PREFRONTAL CORTEX
IN A MOUSE MODEL OF STRESS DISORDER**

А. В. Сербина ¹, А. О. Богданов ¹, Ю. В. Панкратов ²

¹*Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
Институт живых систем, Калининград*

²*Уорикский университет, Школа биологических наук,
Соединенное Королевство, Ковентри*

A. V. Serbina ¹, A. O. Bogdanov ¹, Y. V. Pankratov ²

¹*Immanuel Kant Baltic Federal University, School of Life Sciences, Kaliningrad*

²*The University of Warwick, School of Life Sciences, United Kingdom, Coventry*

E-mail: serbina_elena@bk.ru

Аннотация

Было показано, что в патогенезе посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) важную роль играет изменение активности тормозной системы префронтальной коры. Префронтальная кора контролирует импульсивное поведение и участвует в реализации когнитивных функций мозга [1,2]. Имеющиеся данные об изменении торможения в префронтальной коре при стрессовых состояниях противоречивы: имеются сведения, как об уменьшении [3–5], так и об увеличении активности ГАМКергической системы [6–8]. В данной работе мы моделировали ПТСР у животных и исследовали, каким образом изменение активности ГАМКергической системы под воздействием стресса отразится на пластичности синапсов префронтальной коры и поведении животных.

Abstract

It has been shown that changes in the activity of inhibitory system in the prefrontal cortex play an important role in post-traumatic stress disorder (PTSD) pathogenesis. The prefrontal cortex controls impulsive behavior and brain cognitive functions [1, 2]. The data available on remodeling of inhibition in the prefrontal cortex under stress exposure are contradictory: there is information about both a decrease [3, 4, 5] and an increase in the ac-

tivity of the GABAergic system [6, 7, 8]. Here we used murine model of PTSD to investigate how changes in the activity of the GABAergic system under the exposure of stress would affect synaptic plasticity in the prefrontal cortex and the behavior of animals.

Для воспроизведения экспериментальной модели ПТСР на мышах C57BL мы использовали протокол «единичного длительного стресса» (ЕДС) [9]. Формирование стрессового состояния у животных подтверждали по изменениям, которые возникали в поведении животных после воспроизведения протокола ЕДС. Для оценки поведения животных использовали тест «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Чтобы определить, каким образом меняется активность ГАМКергической системы при формировании ПТСР, мы при помощи технологии пэтч-кламп регистрировали миниатюрные ингибирующие постсинаптические токи (МИПСТ) в пирамидных нейронах третьего слоя префронтальной коры. Для исследования влияния активности тормозной системы на пластичность синапсов регистрировали полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) в третьем слое префронтальной коры и индуцировали долговременную потенциацию (ДВП) при помощи 20 высокочастотных электрических стимулов.

По результатам оценки поведения животных было подтверждено, что после прохождения протокола ЕДС животные действительно проявляют при-

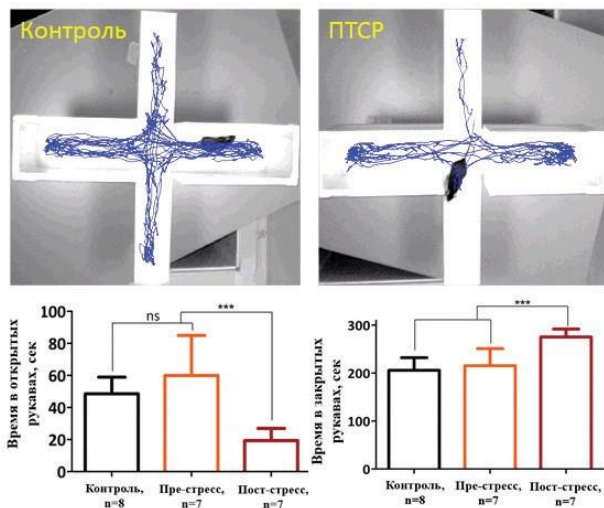


Рис. 1. Результаты тестирования поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте, где *** — $p \leq 0,001$ для теста Стьюдента

знаки тревожного стрессового состояния, наблюдаются увеличение смещенной активности, уменьшение локомоторной активности, превалирование норкового инстинкта и снижение исследовательского поведения (рис. 1). При этом поведение контрольной группы не отличалось от результатов тестирования группы ПТСР до воздействия стресса, что свидетельствует об одинаковом психоэмоциональном состоянии животных до начала эксперимента.

Результаты анализа мИПСТ пирамидных нейронов префронтальной коры свидетельствуют о значительном увеличении активности тормозной синаптической передачи у животных, подвергшихся воздействию стресса. В группе ПТСР амплитуда и частота мИПСТ была значительно выше, чем в контроле (рис. 2).

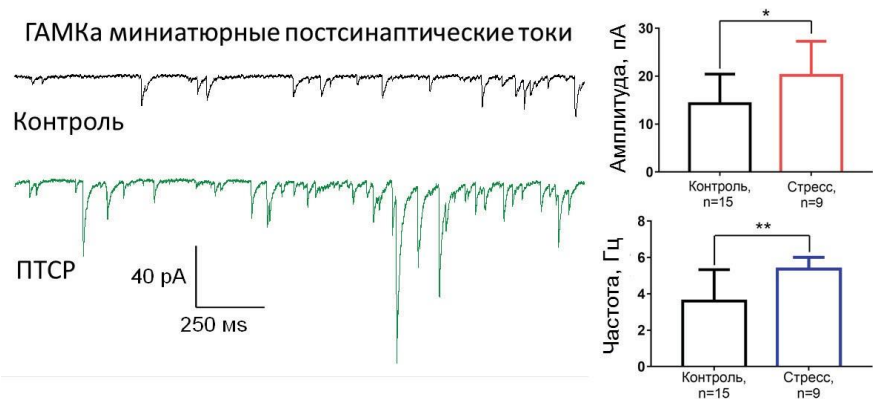


Рис. 2. Стресс увеличивает активность тормозной синаптической передачи в префронтальной коре, где * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$ для теста Стьюдента

Мы также обнаружили, что увеличение активности тормозной синаптической передачи в префронтальной коре животных с модельным ПТСР негативно влияет на способность синапсов к индукции долговременной потенциации (рис. 3).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что воздействие стресса вызывает увеличение активности тормозной синаптической передачи в префронтальной коре. Высокая активность тормозной системы препятствует нормальной индукции ДВП синапсов, что наиболее вероятно связано с наблюдаемыми изменениями в поведении животных, сниженным исследовательским интересом и когнитивными способностями.

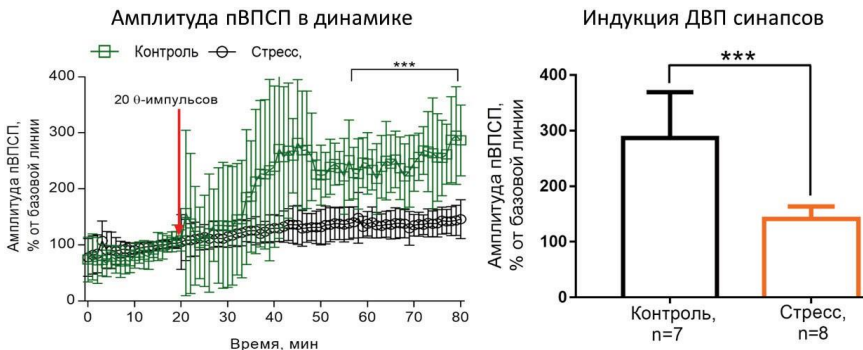


Рис. 3. Стресс ингибирует способность синапсов к индукции долговременной потенциации, где ***— $p \leq 0,001$ для теста Стьюдента

Литература

1. Bremner J. D. Neuroimaging in Posttraumatic Stress Disorder and Other Stress-related Disorders // *Neuroimaging Clin. N. Am.* 2007. Т. 17, № 4. P. 523.
2. Fogaça M. V., Duman R. S. Cortical GABAergic dysfunction in stress and depression: new insights for therapeutic interventions // *Front Cell Neurosci.* 2019. Т. 13. P. 87.
3. Czéh B. et al. Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences // *Hippocampus.* 2015. № 25. P.393–405.
4. Matsumoto K. et al. GABA(A) receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-induced stress: possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood and anxiety disorders // *Stress.* 2007 Mar. Vol. 10(1). P. 3–12.
5. Vaiva G. et al. Low posttrauma GABA plasma levels as a predictive factor in the development of acute posttraumatic stress disorder// *Biological Psychiatry.* 2004 Feb 1. Vol. 55(3). P. 250–254.
6. McKlveen et al. Chronic stress increases prefrontal inhibition: a mechanism for stress-induced prefrontal dysfunction // *Biol. Psychiatry.* 2016. Vol. 80. P. 754–764.
7. Dubin M. J. et al. Elevated prefrontal cortex GABA in patients with major depressive disorder after TMS treatment measured with proton magnetic resonance spectroscopy // *Psychiatry Neurosci.* 2016 Apr. Vol. 41(3). P.E37–45.
8. Michels L. et al. Prefrontal GABA and glutathione imbalance in posttraumatic stress disorder: Preliminary findings // *Psychiatry Research: Neuroimaging.* 2014. Vol. 224. P. 288–295
9. Yamamoto S. et al. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder // *Depress. Anxiety.* 2009. Т. 26, № 12. P. 1110–1117.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО РЕЗЕРВА КРОВОТОКА
В КОРОНАРНЫХ СОСУДАХ МЕТОДОМ ЛОКАЛЬНОЙ
ГЕМОДИНАМИКИ ***

DETERMINATION OF THE FRACTIONAL RESERVE OF BLOOD FLOW
IN CORONARY VESSELS BY THE METHOD OF LOCAL HEMODYNAMICS

А. Т. Суюндукова ¹, В. С. Мельничук ¹, В. П. Дёмкин ¹, К. В. Завадовский ²

¹ Томский государственный университет

² НИИ кардиологии Томского НИМЦ

A. T. Suyundukova ¹, V. S. Melnichuk ¹, V. P. Dyomkin ¹, K. V. Zavadovskiy ²,

¹ Tomsk State University

*² Scientific Research Institute of Cardiology,
Tomsk National Research Medical Center RAS,*

E-mail: almagul.suyundukova@mail.ru, osberg@yandex.ru,
demkin@ido.tsu.ru, konstzav@gmail.com

Аннотация

Целью данной работы является разработка метода вычисления фракционного резерва кровотока для неинвазивной диагностики пациентов с подозрением или известным заболеванием коронарной артерии.

Abstract

The aim of this work is to develop a method for calculating the fractional reserve for the diagnosis of functionally of functionally significant coronary artery stenosis in patients with suspected or known coronary artery disease.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной наиболее распространенных кардиологических заболеваний и основной причиной смертности в мире [1]. ИБС обусловлена стенозирующим атеросклерозом коронарных артерий (КА), который ограничивает кровоток к сердечной мышце и может привести к тяжелым последствиям, в частности, к острому инфар-

© А. Т. Суюндукова, В. С. Мельничук, В. П. Дёмкин, К. В. Завадовский, 2020

* Результаты исследования получены при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ.

кту миокарда и острой сердечной недостаточности. В связи с этим необходима разработка методов и средств оперативной оценки состояния сердечно-сосудистой системы на основе применения быстрых, экономичных и неинвазивных методик диагностики коронарных сосудов, которые пригодны для широкого использования в целях своевременного и оперативного выявления предпатологических состояний [2]. Возможности прямых измерений морфологических и гемодинамических параметров сосудов ограничены, в то время как математическое моделирование коронарного кровотока на основе доступных экспериментальных данных позволяет обеспечить детальную информацию о состоянии сосудов. Успех численного эксперимента зависит от соответствия математической и вычислительной моделей реальным физическим процессам, протекающим в системе кровообращения человека. В общем случае гемодинамические процессы описываются трехмерными нестационарными уравнениями Навье — Стокса совместно с уравнениями динамики эластичных оболочек сосудов с учетом пространственной геометрии сосудов, физических свойств крови и вариации сердечной нагрузки. Решение таких многопараметрических задач связано с огромными вычислительными затратами, что требует применения высокопроизводительных систем и решения проблем, связанных с минимизацией ошибок метода вычисления. Поэтому лучшее в практическом отношении качество или эффективность любой модели достигается как оптимальный компромисс между адекватностью модели к оригиналу и простотой, обеспечивающей необходимую точность и возможность ее использования по прямому назначению.

В данной работе рассмотрена 2D-модель локальной гемодинамики коронарных сосудов и предложен метод вычисления фракционного резерва кровотока для оценки функциональной значимости стенозов коронарных артерий у пациентов с подозрением или установленным диагнозом ИБС. В основу модели заложен ряд принципиальных положений, определяющих особенности гемодинамики в стенозированных сосудах. Для вычисления скорости кровотока использовано уравнение Навье — Стокса совместно с уравнением непрерывности в двумерном приближении. Проведен вычислительный эксперимент по определению фракционного резерва кровотока для значимых размеров стеноза: 40, 50, 60, 70 и 80 % диаметра артерии. Результаты расчетов сравнены с данными более сложных моделей и лабораторных экспериментов. Разработанный метод локальной гемодинамики коронарных сосудов и расчета фракционного резерва кровотока можно использовать для проведения персонализированной оценки значимости стеноза и принятия врачебного решения.

Литература

1. Timmis A., Townsend N., Gale C.P. et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. // Eur Heart J. 2020. Vol. 41(1). P. 12–85. doi:10.1093/eurheartj/ehz859
2. Мочула А. В., Мальцева А. Н., Шипулин В. В., Завадовский К. В. Оценка миокардиального кровотока и резерва — физиологические основы и клиническое значение перфузионной сцинтиграфии в обследовании пациентов с хроническим коронарным синдромом // Российский кардиологический журнал. 2020. Т. 25, № 2. С. 74–80.

ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МОЛОКА КОЗ В ПЕРВЫЕ ДВЕ НЕДЕЛИ ЛАКТАЦИИ

FEATURES OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF GOAT MILK IN THE FIRST TWO WEEKS OF LACTATION

В. В. Тюлина, И. В. Милаёва, М. С. Царькова

*Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина*

V. V. Tjulina, I. V. Milaeva, M. S. Tsarkova

*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology
named after K. I. Skryabin*

E-mail: ira-gurievich@list.ru

Аннотация

По результатам исследования молока коз ультразвуковым методом установлено, что наибольшим колебаниям в течение лактации подвержено содержание жира в молоке и молозиве коз. В первый день лактации содержание жира более низкое, а во второй день повышается в 1,8 раза и удерживается на таком высоком уровне на третий день. В дальнейшем происходит снижение этого показателя до минимального значения в четвертый день, потом повышение на 40,2 % в пятый день и плавное снижение на 10,36 % до девятого дня.

Abstract

According to the results of the study of goat milk by the ultrasound method, it was found that the fat content in the milk and colostrum of goats is subject to the greatest fluctuations during lactation. On the first day of lactation, the fat content is lower, and on the second day it increases by 1,8 times and is kept at such a high level for 3 days. In the future, this indicator decreases to the minimum value on day 4, then increases by 40,2 % on day 5 and gradually decreases by 10,36 % to day 9.

Значимость изучения физико-биологического статуса животного при определении статуса развития и жизнедеятельности его организма в настоящее время очевидна и неоспорима. Физико-биологический статус животного определяется суммой концентраций различных биологически

активных веществ (липидов, белков и т. д.) в биологических жидкостях организма (таких как кровь, молоко, моча и т. д.). Измерение этого статуса может дать ценную информацию о состоянии организма животного, наличии или отсутствии патологий, помочь в оценке хозяйственной ценности и продуктивности животного. Молочное козоводство является перспективной отраслью животноводства и активно развивается. Это связано с особенностями козьего молока, его высокой усвояемостью, возможностью использовать его для детей грудного возраста.

Физико-химический состав молока непостоянен и подвержен влиянию различных факторов, начиная от возраста животного и его рациона питания до его происхождения, периода и номера лактации. Для коз первой лактации на долю железистого аппарата молочной железы приходится примерно $62,6 \pm 0,41$ %, а на долю соединительной ткани $38,1 \pm 0,25$ %. Соотношение паренхимы и стромы составляет 1,8:1. В последующие лактации наблюдается значительное разрастание железистой паренхимы и сокращение стромы — все эти процессы оказывают влияние на синтетические процессы, происходящие в молочной железе, и биохимический состав молока.

Исследовалось молоко физиологически здоровых коз русской белой породы, полученное при первой лактации. По результатам биохимического анализа отмечено, что у коз происходит изменение содержания жира, белка, лактозы, минеральных солей в зависимости от дня лактации.

Таблица 1

Биохимические показатели молока коз в разные дни лактации

%	День 1-й	День 2-й	День 3-й	День 4-й	День 5-й	День 6-й	День 7-й	День 8-й
Жир	$5,89 \pm 1,03$	$9,49 \pm 1,67$	$6,67 \pm 0,63$	$3,80 \pm 0,42$	$8,03 \pm 0,35$	$7,92 \pm 1,61$	$6,66 \pm 0,87$	$5,70 \pm 1,07$
Белок	$5,7 \pm 0,56$	$3,69 \pm 1,52$	$3,53 \pm 1,66$	$4,57 \pm 1,21$	$3,72 \pm 0,93$	$3,38 \pm 0,87$	$3,39 \pm 0,34$	$3,52 \pm 0,43$
Лактоза	$8,41 \pm 0,67$	$5,45 \pm 1,33$	$5,21 \pm 0,94$	$4,60 \pm 1,38$	$5,49 \pm 1,05$	$4,99 \pm 1,24$	$5,01 \pm 0,42$	$5,20 \pm 0,26$
Соли	$1,33 \pm 0,39$	$0,86 \pm 0,75$	$0,82 \pm 0,38$	$0,80 \pm 0,24$	$0,87 \pm 0,95$	$0,79 \pm 1,52$	$0,79 \pm 0,69$	$0,82 \pm 1,97$

Максимальное количество минеральных солей наблюдается в первый день лактации — выше на 35,34 % по сравнению со средним значением

остальных дней, затем показатель снижается до значения 0,8 и изменяется незначительно на 0,5–1 %.

Максимальный уровень лактозы отмечается в первый день лактации выше на 35,2 % по сравнению со средним значением остальных дней, затем снижается, потом повышается на пятый и тринадцатый день, а в остальные дни изменяется в пределах 2–5 %.

Максимальный уровень белка отмечается в первый день лактации выше на 35,26 % по сравнению со средним значением остальных дней, затем этот показатель начинает постепенно снижаться, но снижение происходит нелинейно, так в четвертый день наблюдается повышение уровня белка на 18,24 %, в тринадцатый день небольшое повышение на 13,48 %, а минимальное значение наблюдается на двенадцатый день лактации.

Таблица 2

Биохимические показатели молока коз в разные дни лактации

%	День 8-й	День 9-й	День 10-й	День 11-й	День 12-й	День 13-й	День 14-й
Жир	5,70 ± 1,07	6,94 ± 0,55	10,52 ± 0,81	5,58 ± 0,95	5,67 ± 1,46	8,55 ± 0,14	5,63 ± 0,68
Белок	3,52 ± 0,43	3,42 ± 1,73	3,49 ± 0,49	3,6 ± 0,68	3,33 ± 0,17	4,32 ± 1,28	3,49 ± 0,34
Лактоза	5,20 ± 0,26	5,06 ± 1,68	5,15 ± 1,26	5,31 ± 1,38	4,89 ± 0,29	6,39 ± 1,99	5,16 ± 0,59
Соли	0,82 ± 1,97	0,80 ± 0,29	0,81 ± 1,53	0,81 ± 0,72	0,81 ± 0,37	0,99 ± 1,67	0,81 ± 1,45

Наибольшим колебаниям подвержено содержание жира в молоке и молозиве коз. В первый день лактации содержание жира более низкое, а во второй день повышается в 1,8 раза и удерживается на таком высоком уровне на третий день. В дальнейшем происходит снижение этого показателя до минимального значения в четвертый день, потом повышение на 40,2 % в пятый день и плавное снижение на 10,36 % до девятого дня. На десятый день опять повышение на 10,52 %, потом снижение и на тринадцатый день повышение на 27,38 %, а потом опять снижение на 27,76 %.

Важным показателем является отношение количества жира к количеству белка в молоке и молозиве коз. Для коз первой группы все пробы можно разделить по этому показателю на четыре подгруппы: 1-, 4-й день

лактации 0,8–1; 8-, 11-, 12-, 14-й день — 1,6–1,7; 3-, 5-, 6-, 7-, 9-, 13-й день — 1,9–2,3; 2-, 10-й — 2,6–3.

Таким образом, наиболее существенно отличается молоко первого дня лактации (молозиво), в нем содержится значительно больше солей, лактозы и белка. Наибольшим колебаниям подвержено содержание жира в молоке. Проявляются пики максимального содержания жира во 2-, 3-, 5-, 10-, 13-й день, когда средний уровень жира 8–10 %, в остальные дни общий уровень жира 5–6 %.

МОДЕЛЬ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТКИ ПУРКИНЬЕ
MODEL OF THE MEMBRANE POTENTIAL OF THE PURKINIER CELL

Я. В. Фрицлер, А. Н. Шуваев

Сибирский федеральный университет, Красноярск

Y. V. Fritsler, A. N. Shuvaev

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

E-mail: fri.yana@mail.ru

Аннотация

Построена математическая модель клетки Пуркинье, включающая в себя: два канала Na^+ , три канала K^+ , три канала Ca^{2+} и два типа кальций-активируемых калиевых каналов. В результате получена модель мембранного потенциала клетки Пуркинье, учитывающая сложность структуры с более физиологичным вкладом от ВК-каналов.

Abstract

A mathematical model of the Purkinje cell has been constructed, which includes: two Na^+ channels, three K^+ channels, three Ca^{2+} channels and two types of calcium-activated potassium channels. As a result, a model of the membrane potential of the Purkinje cell was obtained, taking into account the complexity of the structure with a more physiological contribution from ВК channels.

Клетка Пуркинье имеет сложную структуру и функциональную организацию, позволяющие данному типу клеток иметь самый большой синаптический поток в мозге. Регулирование функционирования клеток Пуркинье осуществляется различными ионами: натрия, калия, кальция и т. п.

На данный момент существует ряд математических моделей мембранного потенциала клеток Пуркинье, однако эти модели включают в себя разные наборы сигнальных путей. Так, не существует модели, которая включает в себя сложность структуры клеток Пуркинье и имеет более физиологичный вклад от ВК-каналов.

Модель основана на анатомических реконструкциях отдельных клеток Пуркинье и включает 10 различных типов зависимых от напряжения кана-

лов, описываемых уравнениями Ходжкина — Хаксли, полученных на основе данных фиксации напряжения, специфичных для клеток Пуркинье. Эти каналы включают в себя быстрый и постоянный канал Na^+ , три канала K^+ , зависящих от напряжения, каналы Ca^{2+} Т-типа, Р-типа и R-типа, два типа кальций-активируемых калиевых каналов (ВК).

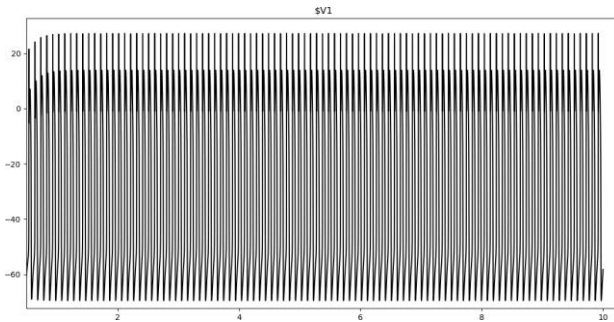
Таким образом, уравнение динамики потенциала мембраны имеет следующий вид:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{-(i_{\text{Na}} + i_{\text{K}} + i_{\text{Ca}} + i_{\text{BK}})}{C_m},$$

где i_{Na} , i_{K} , i_{Ca} , i_{BK} — токи от натриевых, калиевых, кальциевых, кальций-зависимых калиевых каналов, C_m — емкость мембраны.

Так как в модель включены ВК-типы каналов, было необходимо смоделировать динамику кальция: вход кальция осуществляется через VGCC (потенциал-зависимые кальциевые каналы Т-, Р- и R-типа), отток кальция производится РМСА (Ca^{2+} АТФаза плазматической мембраны), моделируемого с помощью уравнения Хилла.

В результате получена динамика мембранного потенциала клеток Пуркинье, показанная на рисунке. Полученный результат соответствует поведению известных моделей и экспериментальным данным.



Динамика потенциала клетки Пуркинье

Построенная математическая модель сохраняет в себе особенности строения и функционирования, но имеет более физиологичный вклад от ВК-каналов.

ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ГЕМОСТАЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕОРИИ НЕЧЕТКИХ МНОЖЕСТВ *

DIAGNOSTICS OF A CONDITION OF GEMOSTASIS WITH THE USE OF FUZZY SET THEORY

А. О. Цыбулина ¹, Л. Ю. Котловская ², В. П. Дёмкин ¹, В. В. Удут ²

¹ *Томский государственный университет*

² *НИИ фармакологии и регенеративной медицины им Е. Д. Гольдберга, Томск*

A. O. Tsibulina ¹, L. Yu. Kotlovskaya², V. P. Demkin ¹, V. V. Udut²

¹ *Tomsk State University*

² *Pharmacology Institute of Tomsk RNMC*

E-mail: aotsibulina1986@mail.ru

Аннотация

Целью научной работы является повышение достоверности медицинской диагностики нарушений системы гемостаза на основе теории нечетких множеств в условиях неопределенных и неполных данных.

Abstract

The aim of the research is to increase the reliability of medical diagnostics of the hemostasis system disorders based on a fuzzy set theory under conditions of uncertain and incomplete data.

Свертывание крови — это сложный биохимический процесс, активируемый повреждениями сосудистой стенки или клеток крови. Расстройства системы гемостаза могут привести к фатальным осложнениям: кровотечению или тромбозу, что делает исследование свертывания крови приоритетным исследованием. Состоятельность кровоснабжения — ключевой позиции нормальной жизнедеятельности — определяется изменениями гемостатического потенциала. Таким образом, адекватная оценка и мониторинг гемостатического потенциала при использовании лекарственных средств,

© А. О. Цыбулина, Л. Ю. Котловская, В. П. Дёмкин, В. В. Удут, 2020

* Результаты исследования получены при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ.

направленных на предупреждение и лечение тромботических осложнений, позволит контролировать кровоток в важных органах, предупреждая острые нарушения и обеспечивая ускорение процессов регенерации.

На сегодняшний день исследователи «вооружены» весомым набором «локальных» и «глобальных» методов оценки системы гемостаза. Однако в рутинной практике используется ограниченный набор, а результаты дают приблизительную характеристику гемостатического потенциала. Расширение арсенала методик, увеличивая диагностическую ценность, дает фрагментарные представления о процессе свертывания крови. Неструктурированность, неточность и неполнота результатов тестов исключает целостное представление о состоянии системы гемостаза. Также имеет место пересечение данных в группах тестов, что запутывает ситуацию, поскольку есть прямые и обратные связи, есть бивалентность действия различных факторов, способствующих и препятствующих коагуляции. Таким образом, гемостатический потенциал как интегральное свойство крови является предметом теории нечетких множеств.

В данной работе представлена физико-математическая модель процесса гемокоагуляции, основанная на фазовых представлениях о структуре крови и изменениях ее вязкоупругих свойств в процессе коагуляции с использованием метода резонансной низкочастотной пьезотромбоэластографии [1]. Комплексная оценка гемостатического потенциала производится на основе обработки данных «локальных» и «глобальных» тестов, характеризующих отдельные факторы процесса свертывания крови и их влияние на изменение вязкоупругих свойств крови с применением теории нечетких множеств. Этот подход к выяснению механизмов изменения вязкостно-упругих характеристик цельной крови, отражающих состояние гемостаза, позволит достичь понимания фармакокинетики лекарственных средств, направленных на предупреждение и лечение тромботических осложнений, позволит контролировать состояние гемостаза и управлять приведением его в норму посредством противотромботической терапии.

Литература

1. Тютрин И. И., Удут В. В. Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. Томск : ТГУ, 2016. 170 с.

раздел 3

Вирусология

ПРОТЕЙНЫЙ БАКТЕРИОФАГ РМ16 ИНДУЦИРУЕТ АДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ *

PROTEUS BACTERIOPHAGE INDUCES
ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE DURING IMMUNIZATION

Ал Аллаф Л.

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

Al Allaf L.

*Novosibirsk State University
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: allaflina@gmail.com

Аннотация

Иммунизация мышей бактериофагом РМ16 вызывает формирование анти-ген-специфических В- и Т-лимфоцитов. Кроме того, стимуляция спленоцитов иммунизированных животных бактериофагом РМ16 или рекомбинантным капсидным белком по-разному влияет на выживание и активацию В- и Т-лимфоцитов.

© Ал Аллаф Л., 2020

* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 19-75-00065.

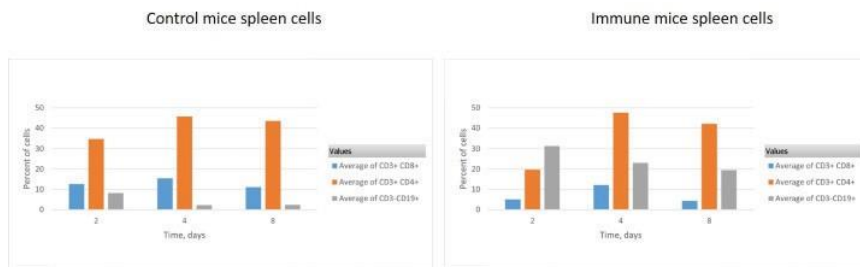
Abstract

We have shown that immunization of mice with proteus bacteriophage PM16 lead to establishment of antigen-specific B- and T-cell populations. Additionally, ex vivo stimulation of immune splenocytes with PM16 phage or its recombinant capsid protein differentially influence T- and B-cell survival, indicating phage may selectively support T-cell response.

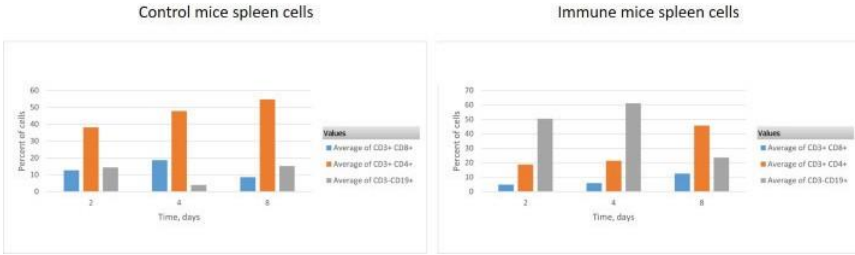
Using phage-therapy as a treatment strategy of bacterial infections has raised a lot of questions about bacteriophages immunogenicity. Recent studies showed that phage-induced immune response depends on different factors.

Current work aimed at evaluation of cell types responsible for adaptive immune reactions against bacteriophages. Mice Balb/c were immunized with bacteriophage PM16 using 10^9 phage forming unit per mice three times. After immunization animals were sacrificed, spleen cells were isolated and stimulated with either PM16 or recombinant capsid protein in vitro in multiple conditions over the course of 8 days. During stimulation, cell phenotype and proliferation status were assessed using flow cytometry.

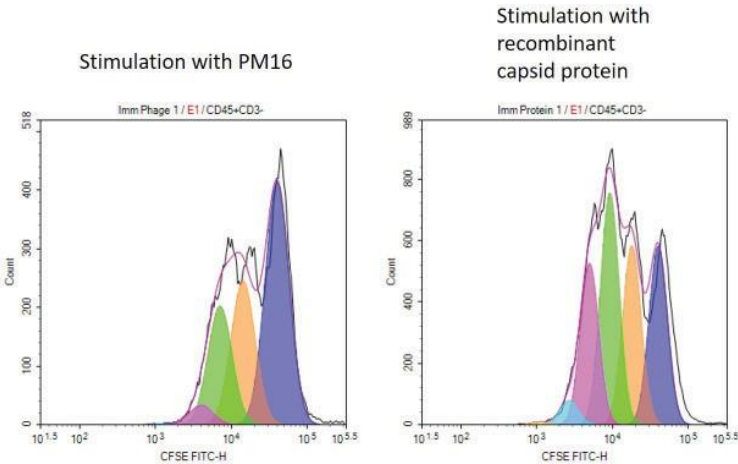
Analysis of cell phenotype dynamics showed that stimulation of control mice cells with either bacteriophage or recombinant capsid protein led to survival of T-helper cells, while B-cells were the minor population showing constant decrease during experimental time course (Pic. 1 and 2). Stimulation of immunized mice cells with bacteriophage led to more prominent B-cell survival (Pic. 1). Interestingly, cells stimulated with recombinant capsid protein showed significantly more prominent B-cell survival compared to T-cell survival. In addition, this stimulation led to survival of follicular B-cells based on number of cells, expressing CD23 surface marker.



Pic. 1. Lymphocyte dynamics during ex vivo cell stimulation with bacteriophage PM16



Pic. 2. Lymphocyte dynamics during *ex vivo* cell stimulation with recombinant phage protein



Pic. 3. CFSE-labelled lymphocyte proliferation analysis after stimulation with bacteriophage PM16 and recombinant capsid protein

To show that cell survival was antigen-specific we analyzed cell proliferation using dilution of cell tracer CFSE. Stimulation of control mice cells with bacteriophage/protein did not stimulate cell proliferation. Cells from immunized mice showed prominent proliferative response both to stimulation with bacteriophage and recombinant capsid protein. Interestingly, stimulation with protein made cells more readily proliferative, generating up to 4 cell populations by day 4.

Our findings demonstrate that bacteriophages may potentially be utilized for immunization or antibacterial treatment to modulate immune response as they both trigger establishment of antigen-specific B-cell population both T-helper dependent and T-helper independent.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ РНК
ГРИППА А И КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРОТОКОЛА ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

DEVELOPMENT OF METHODS FOR INFLUENZA A
AND SARS-CoV-2 RNA DETECTION
USING ISOTHERMAL AMPLIFICATION PROTOCOL

Д. Н. Антропов¹, Е. С. Журавлёв¹, А. Б. Комиссаров²,
Л. К. Курбатов³, Д. С. Новопашина¹, Г. А. Степанов¹

¹Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Научно-исследовательский институт гриппа
им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург

³Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

D.N. Antropov¹, E.S. Zhuravlev¹, A.B. Komissarov²,
L.K. Kurbatov³, D.S. Novopashina¹, G.A. Stepanov¹

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

²*Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg*

³*Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

E-mail: antr0povdn@yandex.ru

Аннотация

Цель исследования — разработать методы выявления вирусных РНК с использованием модифицированного протокола NASBA с детекцией в режиме реального времени и комбинации NASBA с Cas13a-опосредованной интерференцией. В качестве моделей выбраны РНК вирусов гриппа А и коронавируса SARS-CoV-2. Показано, что разработанные протоколы позволяют детектировать присутствие до 10–100 копий фрагментов вирусных РНК в реакции, при этом общее время протоколов детекции составляет менее часа.

Abstract

The aim of the research is the development of the viral RNA detection methods using modified Real-time NASBA protocol and the combination of NASBA and Cas13a-mediated

interference. Influenza A and SARS-CoV-2 RNAs were chosen as the models. It was shown, that the protocols developed allow the detection of down to 10–100 copies of viral RNA fragments in the reaction, with the total run time of the detection protocols being less than an hour.

В условиях сезонных ежегодных эпидемий вирусных инфекций особое значение приобретают методы быстрой и эффективной детекции вирусных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях на ранних стадиях заболевания.

Цель данной работы — разработать методы выявления вирусных РНК с использованием подходов изотермической амплификации. За основу взят протокол амплификации фрагментов РНК, описанный ранее как метод NASBA.

В качестве моделей для исследования выбраны РНК вирусов гриппа А и коронавируса SARS-CoV-2. Для специфичной изотермической амплификации фрагментов вирусных РНК мы использовали комбинацию ферментов, включающую ревертазу M-MuLV, РНКазу H, фрагмент Кленова ДНК полимеразы *E. coli* и РНК-полимеразу фага T7. Нами было показано, что разработанный состав ферментов и реакционного буфера позволяет проводить многократную амплификацию фрагментов РНК-мишеней на 6–8 порядков в течение 15–120 минут.

Одним из перспективных направлений в выявлении РНК патогенов в настоящее время является разработка методов на основе Cas13-опосредованной интерференции. На модельных фрагментах РНК вирусов гриппа А и коронавируса SARS-CoV-2 было показано, что за счет высокого уровня амплификации модифицированный нами протокол может применяться в сочетании с Cas13-опосредованной детекцией. Общее время проведения реакции амплификации с последующей визуализацией результата за счет расщепления неспецифического РНК-субстрата с флуоресцентной меткой может составлять менее часа.

Альтернативным подходом к визуализации результатов реакции изотермической амплификации является детекция в режиме реального времени с применением интеркалирующего красителя SYBR Green II. Было показано, что амплификация целевого фрагмента вирусных РНК происходит с экспоненциальным ростом в течение первых 30–40 минут, что позволяет количественно детектировать фрагменты РНК вирусов гриппа А и коронавируса SARS-CoV-2 с чувствительностью до 10–100 копий.

Разработанные протоколы амплификации и детекции вирусных РНК могут стать основой для разработки новых систем диагностики инфекционных заболеваний человека.

**ПРОИЗВОДНЫЕ (1S)-(+)-КАМФОРА-10-СУЛЬФОКИСЛОТЫ
В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ФИЛОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ*****DERIVATIVES OF (1S)-(+)-CAMPHOR-10-SULFONIC ACIDS
AS INHIBITORS OF FILOVIRUS INFECTIONS**

Д. В. Баранова¹, А. С. Соколова¹, О. И. Яровая¹, Д. Н. Щербаков²,
Е. Д. Мордвинова², Н. Ф. Салахутдинов¹

¹Институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

²Государственный научный центр вирусологии

и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

D. V. Baranova¹, A. S. Sokolova¹, O. I. Yarovaya¹, D. N. Shcherbakov²,
E. D. Mordvinova², N. F. Salakhutdinov¹

¹N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk

²State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: Darya_B00@mail.ru

Аннотация

Изучение влияния гетероциклических заместителей и функциональной группы (1S)-(+)-камфора-10-сульфокислоты на противовирусную активность в отношении филовирусов.

Abstract

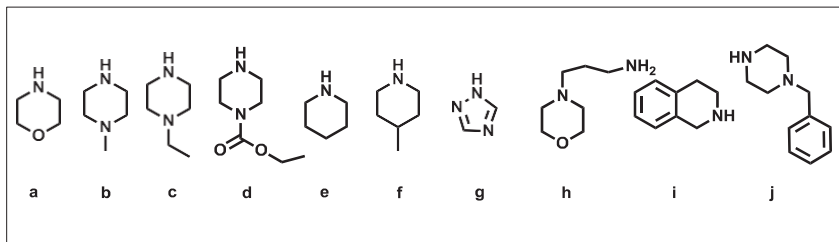
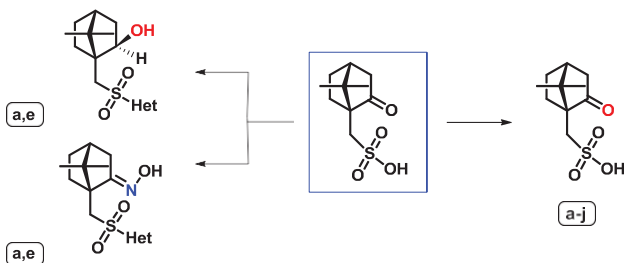
Study of the influence of heterocyclic substituents and functional group of (1S)-(+)-camphor-10-sulfonic acid on antiviral activity in relation to filoviruses.

Разработка эффективных противовирусных агентов, обладающих широким спектром противовирусной активности, особенно актуальна в случае поиска веществ, проявляющих активность в отношении эмерджентных вирусов. В современной медицинской химии для повышения эффективности фармакологически активных веществ используют метод функционали-

© Д. В. Баранова, А. С. Соколова, О. И. Яровая, Д. Н. Щербаков, Е. Д. Мордвинова, Н. Ф. Салахутдинов, 2020

* Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда, грант 19-73-00125.

зации заведомо биологически активных соединений. Данный метод может включать в себя, например, введение в остов гетероциклических фрагментов или изменение функциональных групп. Камфора — бициклический монотерпеноид, имеющий 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептановый остов. Ранее нами было показано, что гетероциклические производные камфоры являются перспективным исходным соединением для синтеза ингибиторов вирусных инфекций [1, 2]. Целью данной работы было проведение химических модификаций производного камфоры — (1*S*)-(+)-камфора-10-сульфо-кислоты и изучение противовирусных свойств синтезированной библиотеки соединений (см. рисунок).



В результате работы получен широкий ряд сульфамидов для последующего исследования в отношении филловирсов. С использованием псевдо-вирусной системы, имеющей на своей поверхности гликопротеины вируса Марбург и Эбола обнаружена высокая противовирусная активность синтезированных агентов на ранней стадии вирусной репликации. Установлено, что присутствие заместителя в С-2 положении амидов (1*S*)-(+)-камфора-10-сульфо-кислоты ответственно за проявление противовирусной активности в отношении вируса Эбола.

ПОЛУЧЕНИЕ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА
ГРИППА В С ХИМЕРНЫМ ГЕМАГГЛЮТИНИНОМ
НА ОСНОВЕ ЛИНИЙ ВИКТОРИЯ И ЯМАГАТА *

RESCUE OF COLD-ADAPTED INFLUENZA B STRAIN
WITH CHIMERIC HEMAGGLUTININ BASED
ON VICTORIA AND YAMAGATA LINEAGES

П.-Ф. Вонг, Е. В. Крутикова, Е. А. Баженова, К. В. Баранов, Е. А. Степанова

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

P.-F. Wong, E. V. Krutikova, E. A. Bazhenova, K. V. Baranov, E. A. Stepanova

Institute of experimental medicine, St. Petersburg

E-mail: po333222@gmail.com

Аннотация

Получен штамм вируса гриппа В с химерным гемагглютинином, head-домен которого получен от вируса линии В/Виктория, stalk-домен — от вируса линии В/Ямагата. Внутренние гены вируса унаследованы от донора аттенуации живой гриппозной вакцины типа В. Химерный реассортант будет использоваться для разработки живой гриппозной вакцины с расширенными протективными свойствами против штаммов гриппа В, относящихся к разным генетическим линиям.

Abstract

Influenza B strain expressing chimeric hemagglutinin (HA) was rescued. The head domain of this HA is taken from the B/Victoria lineage strain, and stalk domain is from the B/Yamagata (B/Yam) lineage strain. The neuraminidase (NA) gene is from the B/Victoria (B/Vic) lineage strain. Internal genes of the virus are inherited from the Russian master donor virus for live attenuated influenza vaccine of B subtype. The engineered reassortant might be used to develop live influenza vaccines with broad protective capacity against both lineages of influenza B virus.

Introduction

Worldwide co-circulation of two influenza B genetic lineages — B/Victoria and B/Yamagata underscores the need of vaccines with broad cross-protective potential. To induce a cross-protective immunity, a promising approach is the development of genetically engineered formulations containing antigenic sites from both genetic lineages. The HA stalk domain is relatively conserved but poorly immunogenic. Therefore, targeted induction of HA stalk-specific antibodies might result in broader cross-protection. We developed a reassortant strain with chimeric HA, to study the potential of sequential immunization strategy for inducing cross-lineage protection after immunization.

Materials and methods

Influenza B viruses B/Brisbane/60/2008 (B/Vic) and B/Phuket/3073/2013 (B/Yam) were received from CDC USA. Master donor virus of Russian LAIV B/USSR/60/69 (B60) was developed at the Institute of Experimental Medicine. For plasmid construction, Phusion Green Hot Start II High-Fidelity polymerase and SuperScript III One-Step RT-PCR kits were used for PCR amplification. Restriction enzymes BsmBI and SapI, T4 ligase were used in restriction digest and ligation. The virus was rescued through standard 8-plasmid protocol, pCIPolISapIT vector (CDC USA) was used for reverse genetics of the reassortant.

Results

3 fragments of HA were obtained: the 1st fragment starting from 5'-UTR to nt 202 of B/Yam virus, the 2nd fragment containing nt from 203 to 957 (corresponds to head domain, from A42 to A293 aa) of B/Vic virus, the 3rd fragment covering residues from 955 nt to the end of the segment of B/Yam virus. BsmBI sites between these fragments were generated by primers in PCR. The chimeric HA segment was constructed by triple ligation of fragments. Chimeric HA gene was cloned into pCIPolISapIT plasmid by SapI sites. 8 plasmids, encoding influenza B genes: chimeric HA, NA from B/Vic strain, 6 genes from B60 virus, were co-transfected by electroporation of Vero cells to rescue the chimeric virus. Hemagglutination activity of chimeric HA of the rescued virus with 1 % chicken red blood cells is 128.

Conclusions

Reassortant of influenza B virus with chimeric HA domains from two different genetic lineages, based on the cold-adapted influenza B strain B60, was rescued. The ability of engineered reassortant to induce cross-reactive immune response against both influenza B lineages strains will be further evaluated using a sequential immunization schedule.

**ИЗОЛЯЦИЯ, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ ДВУХ НОВЫХ ШТАММОВ ВИРУСА НГАРИ,
ОБНАРУЖЕННЫХ В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ В ГВИНЕЕ**

**ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND PHYLOGENETIC ANALYSIS
OF TWO NEW STRAINS OF NGARI VIRUS DETECTED
IN IXODID TICKS FROM GUINEA**

А. В. Гладышева, Р. Б. Баяндин, Е. В. Протопопова, В. А. Святченко

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

A. V. Gladysheva, R. B. Bayandin, E. V. Protopopova, V. A. Svyatchenko

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru

Аннотация

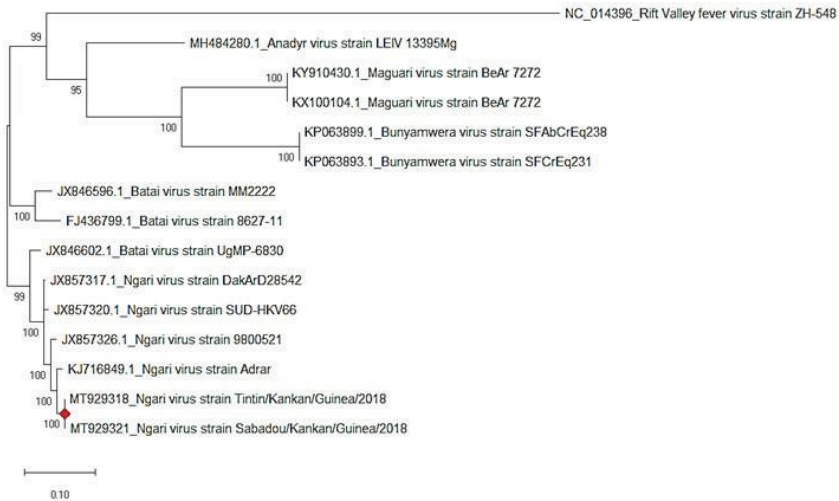
Вирус Нгари (NRIV) — переносимый комарами вирус из рода *Orthobunyavirus*. Является высокопатогенным и способен вызывать геморрагическую лихорадку у человека. Нами впервые был обнаружен вирус Нгари на территории Гвинеи — в иксодовых клещах, собранных с крупного рогатого скота. Посредством пассирования на культуре клеток Vero было выделено два штамма Tintin/Kankan/Guinea/2018 и Sabadou/Kankan/Guinea/2018 NRIV. Инфекционный титр вируса составил 10^7 ТЦПД₅₀/мл. Выполнено полногеномное секвенирование обоих штаммов NRIV. Общая длина генома NRIV — 12 269 п. о. Уровень гомологии нуклеотидной последовательности с наиболее близким штаммом Adrag NRIV составил 96 (сегмент S) и 98 % (сегменты M, L). При этом данные штаммы кластеризовались в отдельную генногруппу на филогенетическом дереве.

Abstract

The Ngari virus (NRIV) is a mosquito-borne virus of the genus *Orthobunyavirus*. This virus is pathogenic for humans and associated with hemorrhagic fever. We are detected of the Ngari virus in ixodid ticks collected from cattle in Guinea. The Tintin/Kankan/Guinea/2018 and Sabadou/Kankan/Guinea/2018 strains of the Ngari virus were isolated with using Vero cells. The virus infectious titer was 10^7 TCID₅₀/ml. The sequences of complete genome of the NRIV were determined. The length of the NRIV genomes are 12 269 bp. The

level of the nucleotide sequence identity with the closest Adrar strain of NRIV was 96 % (S-segment) and 98 % (M, L-segments), respectively. Moreover, these strains were clustered into a separate genetic group on the phylogenetic tree.

Вирус Нгари — переносимый комарами вирус из рода *Orthobunyavirus* (семейство *Peribunyaviridae*, отряд *Bunyavirales*). Данное семейство является одним из самых крупных и содержит более 170 вирусов, в том числе несколько вирусов, имеющих важное значение для общественного здравоохранения. NRIV является высокопатогенным и способен вызывать геморрагическую лихорадку у человека. Геном NRIV состоит из трех сегментов РНК отрицательной полярности: S, M и L. NRIV — это естественный реассортант двух ортобуньявирусов: Bunyamwera (сегменты L и S) и Batai (сегмент M). На сегодня в международной базе GenBank депонировано всего лишь 5 полногеномных последовательностей NRIV.



Филогенетическое дерево, построенное по М-сегменту NRIV

В данном исследовании впервые был обнаружен вирус Нгари на территории Гвинеи. Был произведен скрининг иксодовых клещей, собранных с крупного рогатого скота в регионах г. Киндия и Канкан. ПЦР-анализом в 12 пулах клещей (*Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus geigy*, *Rh. boophilus*) была обнаружена РНК вируса Нгари. Далее посредством пассирования на культуре клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) было выделено два штамма Tintin/Kankan/Guinea/2018 и Sabadou/Kankan/Guin-

ea/2018 NRIV. Инфекционный титр вируса составил 10^7 ТЦПД₅₀/мл. Нами было произведено полногеномное секвенирование всех трех сегментов штаммов Tintin/Kankan/Guinea/2018 и Sabadou/Kankan/Guinea/2018. Проведено депонирование полногеномных последовательностей в международной базе данных GenBank под номерами MT929317–MT929322. Общая длина генома NRIV составила 12 269 нуклеотидов: сегмент S — 954 п. о., сегмент M — 4439 п. о., сегмент L — 6876 п. о. Филогенетический анализ однозначно показал, что обнаруженные штаммы NRIV являются реассортантами и имеют S-сегмент вируса Bunyamwera, и M-сегмент вируса Batai (см. рисунок). Наиболее близкородственным к штаммам Tintin/Kankan/Guinea/2018 и Sabadou/Kankan/Guinea/2018 является штамм Adrar NRIV (GenBank ID: KJ716848), который был изолирован в Мавритании в 2010 году от коз во время вспышки лихорадки долины Рифт. Уровень гомологии нуклеотидной последовательности составил 96 (по сегменту S) и 98 % (по сегментам M, L). При этом оба штамма кластеризовались в отдельную генно-группу на филогенетическом древе.

В ходе данного исследования на территории Гвинеи в иксодовых клещах, собранных с крупного рогатого скота, впервые был обнаружен вирус Нгари. Определенные нами полногеномные последовательности штаммов Tintin/Kankan/Guinea/2018 и Sabadou/Kankan/Guinea/2018 станут основой для будущих исследований, направленных на изучение генетических особенностей NRIV, связанных с изменением вирулентности при реассортации буньявирусов, а также будут использованы для совершенствования генетической диагностики этой инфекции.

**АВУЛАВИРУСЫ ПТИЦ, ВЫЯВЛЕННЫЕ
ВО ВРЕМЯ МОНИТОРИНГА ВИРУСОВ ГРИППА А
НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ В 2019 Г. ***

AVIAN AVULAVIRUSES DETECTED DURING THE MONITORING
OF INFLUENZA A VIRUSES IN THE TERRITORY OF SIBERIA IN 2019

А. А. Дерко^{1,2}, Н. А. Дубовицкий¹, А. Г. Мархаев¹, Т. А. Мурашкина¹,
А. А. Суворова¹, К. А. Шаршов¹, А. М. Шестопалов¹

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск
²Новосибирский государственный университет

A. A. Derko^{1,2}, N. A. Dubovitskiy¹, A. G. Markhaev¹,
T. A. Murashkina¹, A. A. Suvorova¹, K. A. Sharshov¹, A. M. Shestopalov¹

¹Federal Research Center of Fundamental
and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk
²Novosibirsk State University

E-mail: a.derko@g.nsu.ru

Аннотация

В ходе мониторинга вирусов гриппа А у диких водоплавающих птиц Сибири было выявлено 23 гемагглютинирующих вируса, которые по результатам ПЦР не являлись вирусом гриппа А. По итогам полногеномного секвенирования было установлено, что данные изоляты относятся к подсемейству *Avulavirinae* и принадлежат к двум видам авулавировусов: ААvV-4 и ААvV-6. Все изоляты были получены от птиц рода *Anas*, семейства утиные (*Anatidae*).

Abstract

During the monitoring of influenza A viruses in wild waterfowl in Siberia, 23 hemagglutinating viruses were detected, which, according to the results of PCR, were not influenza A. Based on the results of genome-wide sequencing, it was found that these viruses

© А. А. Дерко, Н. А. Дубовицкий, А. Г. Мархаев, Т. А. Мурашкина, А. А. Суворова, К. А. Шаршов, А. М. Шестопалов, 2020

* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 20-44-07001.

belong to two species, AAvV-4 and AAvV-6 of Avulavirinae subfamily. All isolates were obtained from birds of the genus *Anas*, family *Anatidae*.

Авулавирусы птиц (AAvV) составляют подсемейство *Avulavirinae* семейства *Paramyxoviridae*. AAvV-4 и AAvV-6 способны вызывать респираторные заболевания и нарушения в репродуктивной системе птиц. Об обнаружении AAvV часто сообщается в рамках мониторинга вирусов гриппа у диких водоплавающих птиц в разных странах. Синергический эффект между разными видами РНК-вирусов в пределах организма одного хозяина может значительно влиять на динамику заболевания. Так, например, наблюдалось увеличение распространенности птичьего коронавируса у птиц, коинфицированных вирусами гриппа [1].

В 2019 году было собрано 1178 клоакальных мазков от диких птиц из 7 регионов Сибири. В результате культивирования проб на развивающихся куриных эмбрионах [2] было получено 23 гемагглютинирующих изолята, которые были проверены на наличие гена М вируса гриппа А методом ПЦР «в режиме реального времени» с использованием набора реагентов «Амплиценс Influenza virus A/B-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) на амплификаторе «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, США). По результатам ПЦР все 23 изолята не содержали искомого гена. Полногеномное секвенирование проводили на платформе Miseq (Illumina, США), РНК получали при помощи набора «RNeasy Mini» (Qiagen, Германия). Библиотеки кДНК готовили с использованием набора для подготовки «NEBNext Ultra RNA Library Prep» (New England Biolabs, США). В результате было установлено, что 14 изолятов из 23 относятся к виду авулавирус AAvV-4, а 9 изолятов — к виду авулавирус AAvV-6 (см. таблицу).

Все изоляты были выделены от 8 видов отряда гусеобразные (*Anseriformes*), семейства утиные (*Anatidae*), рода *Anas*. Наибольшее количество изолятов было получено от особей вида чирок-свистунки (*Anas crecca*). Процент выделения всех авулавирусов от общего количества собранных проб составил 1,95 (95 % ДИ: 1,16–2,74 %). Для вирусов гриппа А, выделенных в этих же регионах в 2019 г., этот показатель составил 3,99 (95 % ДИ: 2,87–5,11 %).

Количество проб, собранных в разных регионах Сибири в 2019 г.

Место сбора	Количество проб	Количество выделенных изолятов AAvV-4 *	Количество выделенных изолятов AAvV-6 **
Новосибирская область	225	0	0
Омская область	191	1	3
Республика Тыва	35	0	0
Республика Бурятия	245	2	1
Приморский край	323	7	2
Амурская область	104	2	3
Сахалинская область	55	2	0
Всего	1178 (100 %)	14 (1,19 %)	9 (0,76 %)

* AAvV-4 — авулавироз птиц 4, род *Paraavulavirus*

** AAvV-6 — авулавироз птиц 6, род *Metaavulavirus*

Авулавирусы AAvV-4 и AAvV-6 обладают гемагглютинирующей активностью, что позволяет выявить их из общего количества проб при помощи стандартной методики проведения РГА [2]. Однако, согласно имеющимся в литературе данным, не все штаммы данных видов имеют гемагглютинирующую активность. Ежегодные единичные сообщения о выделении новых изолятов с изменениями в геноме, как высоко-, так и низкопатогенными, говорят о том, что различные авулавирусы одновременно развиваются среди широкого спектра видов птиц по всему миру [3]. Патогенный потенциал вирусов подсемейства *Avulavirinae*, представленность этих вирусов в популяциях птиц, соотношение с вирусом гриппа А на данный момент остаются неизвестными и требуют дальнейшего изучения.

Литература

1. Wille M., Avril A., Tolf C., Schager A., Larsson S., Borg O., Olsen B., Waldenström J. Temporal dynamics, diversity, and interplay in three components of the virodiversity of a Mallard population: Influenza A virus, avian paramyxovirus and avian coronavirus // *Infection, Genetics and Evolution*. 2015. Vol. 29. P. 129–137.
2. McGinnes L.W., Pantua H., Reitter J., Morrison, T. G. Newcastle Disease Virus: Propagation, Quantification, and Storage // *Current Protocols in Microbiology*. 2006. 1: 15F.2.1–15F.2.18.
3. Aziz-ul-Rahman Munir M., Shabbir M. Z. Comparative evolutionary and phylogenetic analysis of Avian avulaviruses 1–20 // *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2018. Vol. 127. P. 931–951.

СЛУЧАИ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 У НОВОРОЖДЕННЫХ В НОВОСИБИРСКЕ**DETECTION OF SARS-COV-2 RNA IN NEWBORNS IN NOVOSIBIRSK**

Е. П. Емельянова¹, Ю. В. Кононова¹, Е. В. Замятина²,
Е. А. Казачкова¹, О. П. Хрипко¹, И. А. Цыцорина²,
Е. С. Серебrenникова², В. И. Гогонина², А. М. Шестопалов¹

¹ *Научно-исследовательский институт экспериментальной
и клинической медицины, Новосибирск*

² *Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск*

E. P. Emelianova¹, Y. V. Kononova¹, E. V. Zamyatina²,
E. A. Kazachkova¹, O. P. Khripko¹, I. A. Tsytsorina²,
E. S. Serebrennikova², V. I. Gogonina², A. M. Shestopalov¹

¹ *Research Institute of Experimental and Clinical Medicine
FRC FTM SB RAS, Novosibirsk*

² *Central Clinical Hospital SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: blood-boom-chacha@mail.ru

Аннотация

COVID-19 — инфекционное заболевание, вызываемое коронавирусом SARS-CoV-2. Коронавирусы — семейство РНК-содержащих вирусов. Авторы представляют результаты диагностики COVID-19 у новорожденных, проводившейся с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Abstract

COVID-19 is a new infectious disease caused by the SARS-CoV-2 coronavirus. Coronaviruses are a family of RNA viruses. The authors present the results of the diagnosis of COVID-19 in newborns, which is carried out using real-time RT-PCR.

Важную роль в понимании проблем, связанных с COVID-19, играет возможность внутриутробного трансплацентарного инфицирования.

Данные о перинатальной инфекции SARS-CoV-2 по-прежнему остаются малочисленными.

На базе ФИЦ ФТМ СО РАМН в период с апреля по сентябрь 2020 года была проведена диагностика образцов пуповинной крови, мазков с последа и кала 55 новорожденных, а также молозива их матерей на наличие SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Пробы были получены для диагностики из родильного дома ЦКБ СОРАН.

По результатам ПЦР, у трех новорожденных было выявлено наличие SARS-CoV-2 в пробах кала и у одного — положительная проба пуповинной крови. Эти пробы были получены от разных пациентов. Также SARS-CoV-2 был обнаружен в пробах из последа и плода, полученных в результате выкидыша на сроке беременности 19–20 недель у инфицированной, получившей полный курс лечения и имевшей на момент поступления в роддом отрицательный мазок матери.

На основе полученных данных можно говорить о возможности вертикальной трансмиссии SARS-CoV-2. Проблема перинатального COVID-19 требует дальнейшего всестороннего исследования.

Литература

1. Вашукова М. А., Цинзерлинг В. А., Семенова Н. Ю., Луговская Н. А., Наркевич Т. А., Суханова Ю. В. Возможна ли перинатальная COVID-19: первые результаты // Журнал инфектологии. 2020. № 12(3). С. 51–55.
2. Чепурнов А. А., Шаршов К. А., Казачинская Е. И., Кононова Ю. В., Казачкова Е. А., Хрипко О. П., Юрченко К. С., Алексеев А. Ю., Воевода М. И., Шестопалов А. М. Антигенные свойства изолята коронавируса SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/202, выделенного от пациента в Новосибирске // Журнал инфектологии. 2020. № 12(3). С. 42–50.

ОРИГИНАЛЬНЫЙ БАКТЕРИОФАГ ENTEROBACTER, EC151

A NOVEL ENTEROBACTER BACTERIOPHAGE, EC 151

Г. А. Ждид^{1,2}, В. В. Морозова², Ю. Н. Козлова²,
А. Ю. Тикунов^{1,2}, Н. В. Тикунова^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

G. A. Jdeed^{1,2}, V. V. Morozova², Yu. N. Kozlova²,
A. Yu. Tikunov^{1,2}, N. V. Tikunova^{1,2}

¹Novosibirsk State University

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosiborsk

E-mail: ghadeerjdeen@outlook.com

Аннотация

Выделен и охарактеризован новый бактериофаг EC151, специфичный к штамму *Enterobacter cloacae* КЭМТК 2064. По морфологии капсида бактериофаг был отнесен к семейству *Siphoviridae*. Размер генома EC151 составил 60,754 н. п. В геноме содержится 50 предполагаемых открытых рамок считывания, 36 из которых кодируют белки с известными функциями. По данным филогенетического анализа основных структурных белков фага, они имеют большее сходство с белками бактериофагов, специфичных к *Escherichia*, *Pseudomonas* и *Vibrio*, чем с белками других энтеробактерных бактериофагов. Предположительно, бактериофаг EC151 относится к новому роду семейства *Siphoviridae*.

Abstract

A novel bacteriophage EC151 specific to the *Enterobacter cloacae* strain CEMTC 2064 was isolated and characterized. It was assigned to the family *Siphoviridae* according to the morphology of the capsid. The size of the EC151 genome was 60754 b.p. The phage genome contains 50 putative open reading frames, 36 of which encode proteins with predicted functions. According to the phylogenetic analysis of the main proteins of the phage EC151, a greater similarity was found with the proteins of bacteriophages specific to *Escherichia*, *Pseudomonas*, and *Vibrio*, than with the proteins of other *Enterobacter* phages. And according to the same analysis, the phage EC151 was suggested to belong to a new genus of the family *Siphoviridae*.

The genus *Enterobacter* includes anaerobic, motile, gram negative bacilli, belonging to the family *Enterobacteriaceae*. The genus *Enterobacter* includes 22 species. Among them, only certain ones are associated with hospital acquired infections. *Enterobacter* species are members of the ESKAPE group, the leading cause of resistant nosocomial infections. bacteriophages represent a promising alternative to antibiotics to treat infections caused by antibiotics resistant bacteria. Currently, there are 33 genomes of *Enterobacter* phages in the NCBI GenBank database.

Here, we report the genome sequence and characteristics of a novel phage EC151 that infects *Enterobacter cloacae* CEMTC 2064. According to the structure of the virion (Fig. 1), the phage EC 151 was classified to *Siphoviridae* family. The EC151 genome has 60,754 base pairs and contains 50 putative genes, 36 of them encode proteins of predicted function based on sequence similarity, these include: structural proteins, and enzymes like RNase, helicase and DNA polymerase, the existence of the latter indicates that the EC151 phage doesn't need to use the bacterial polymerase when replicating (Fig. 2).

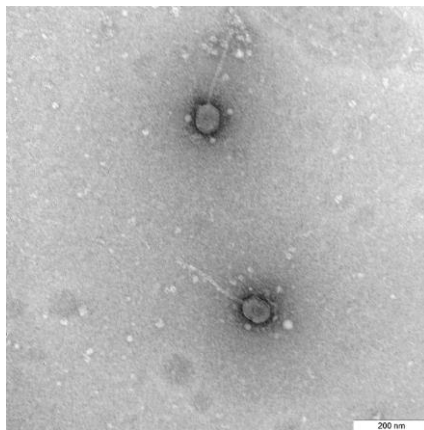


Fig. 1. EC151 virion

Phylogenetic analysis of the EC151 putative proteins revealed that some of the key genes' products of the EC151 genome (capsid protein, terminase, DNA polymerase, and tape measure protein) have more similarities with proteins from *Escherichia*, *Pseudomonas* and *Vibrio* phages, than with the proteins of other *Enterobacter* phages (Fig. 3). The analysis suggested that *Enterobacter* phage EC 151 belongs to a new genus in the *Siphoviridae* family.

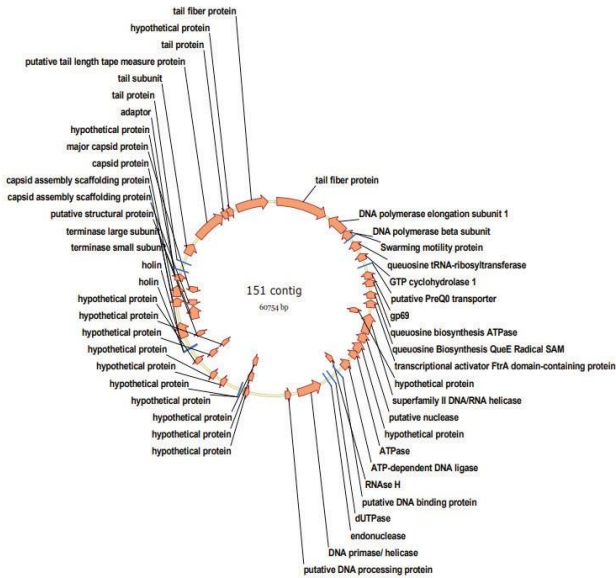


Fig. 2. EC151 annotated genome

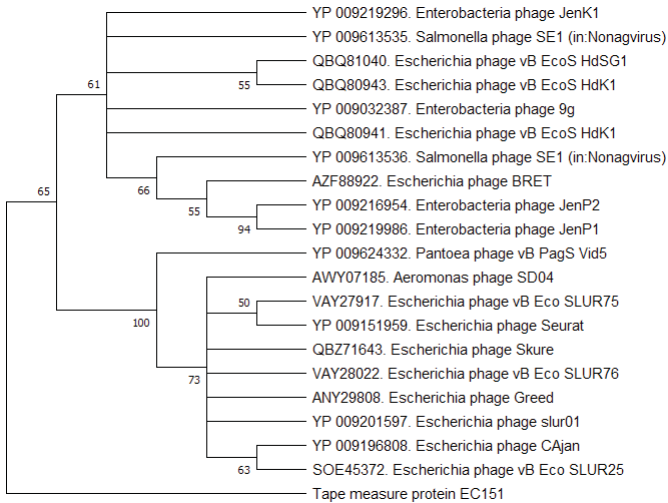


Fig. 3. Phylogenetic tree comparison of EC151 tape measure protein with proteins of similar phages

**РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ОРТОПНЕУМОВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

**NEW DIAGNOSTIC TEST KIT FOR ORTHOPNEUMOVIRUS IN CATTLE
USING INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY**

Е. А. Журавлёва

*Федеральный научный центр —
Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии РАН им. Я. Р. Коваленко и К. И. Скрибина, Москва*

E. A. Zhuravleva

*All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after K. I. Scriabin and Y. R. Kovalenko, Moscow*

E-mail: zhuravleva.zhenya@gmail.com

Аннотация

Ортопневмовирусная инфекция крупного рогатого скота, ранее респираторно-ноцицициальная инфекция (РСИ КРС), принадлежит к роду Orthopneumovirus семейства Pneumovirinae. За рубежом считается одним из основных возбудителей респираторных заболеваний крупного рогатого скота, особенно молодняка. Эта инфекция встречается и в России. Разработанная тест-система, использующая метод непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) позволяет выявить антитела к ортопневмовирусной инфекции в сыворотке крови переболевших и вакцинированных животных.

Abstract

Orthopneumovirus infection of cattle, formerly known as bovine respiratory syncytial virus infection (BRSV), belongs to the genus Orthopneumovirus of the Pneumovirinae family. Abroad, it is considered one of the main causative agents of respiratory diseases in cattle, especially young animals. This infection is also found in Russia. A newly-developed test kit using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) makes it possible to detect antibodies to orthopneumovirus infection in the blood serum of recovered and vaccinated animals.

Ортопневмовирусная инфекция (респираторно-синцитиальная инфекция, РСИ) крупного рогатого скота (КРС) характеризуется высокой заболеваемостью (порядка 80 %) и смертностью не более 2–3 %. Инфекция распространена во многих странах, встречается и в России. Недостаточная оснащенность лабораторий диагностическими средствами не позволяет оценить реальную распространенность РСИ. Лабильность возбудителя осложняет проведение вирусологического исследования, что повышает значимость ретроспективной диагностики. Нами была разработана и испытана тест-система для выявления антител к возбудителю РСИ при помощи иммуноферментного анализа. В качестве антигена был использован штамм 375, специфичность которого подтверждали методом иммунохроматографии с использованием коммерческого набора RSV Stick One Step (Израиль). Культуральный вирус с титром 5–5,5 lg ТЦД₅₀/см³ концентрировали осаждением на ультрацентрифуге при 35 тыс. об/мин в течение 1,5 часов и очищали в градиенте сахарозы. В качестве конъюгата использовали антитела кролика к иммуноглобулинам КРС, меченные пероксидазой хрена. Оптимальная концентрация антигена составила 100 мкг/мл с временем адсорбции 1 ч при 37 °С. Оптимальное разведение сыворотки составило 1:100, время инкубации 1 час при температуре 20 °С или 30 мин при 37 °С. Экспозиция с мечеными антителами составляла 30 мин при температуре 20 °С; уменьшение до 15 минут приводило к снижению чувствительности, а увеличение до 1 часа не оказывало существенного влияния. В качестве субстрата был использован коммерческий раствор тетраметилбензидина. Оптимальное время инкубации с субстратом составило 15 минут. Для определения специфичности, чувствительности и диагностической ценности тест-системы в испытаниях были включены пробы сыворотки переболевших РСИ, вакцинированных животных, иммунная сыворотка к вирусам инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, болезни слизистых, парагриппа-3, фетальная сыворотка. Предварительно все пробы были исследованы в реакции нейтрализации (РН) для определения антител к возбудителю РСИ. Результаты ИФА учитывали по изменению оптической плотности при длине волны 450 — 605 нм. Ложноположительные реакции не превышали 4 %, ложноотрицательные отсутствовали, совпадаемость ИФА и РН составила 95,8 %, воспроизводимость — 98 %.

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ ПСЕВДОВИРУСОВ ЭБОЛА ***CREATION OF THE EBOLA PSEUDOVIRUS PANEL**

А. В. Зыбкина, Д. Н. Щербаков

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

A. V. Zybkina, D. N. Shcherbakov

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: zybkina_av@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе описано создание панели рабдовирусных и лентивирусных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином (GP) вируса Эбола. Для получения псевдовирусных частиц сконструированы плазмиды, содержащие гены GP. Проведен анализ функциональной активности полученных псевдовирусных частиц.

Abstract

The work describes the creation of a panel of rhabdovirus and lentiviral particles pseudotyped with the surface glycoprotein (GP) of the Ebola virus. To obtain pseudoviral particles, plasmid genes GP were constructed. The analysis of the functional activity of the obtained pseudoviral particles was carried out.

Вирус Эбола вызывает геморрагическую лихорадку с высоким уровнем летальности. Крупные вспышки в Западной Африке в 2014–2015 годах и Демократической Республике Конго в 2018–2019 годах заставляют обратить повышенное внимание на эту группу вирусов. В настоящее время отсутствуют лицензированные препараты против вируса Эбола. Разработку препаратов задерживают в том числе строгие правила и опасность работы с натуральным вирусом. В последнее время разработан ряд подходов, позволяющих изучать особенности гуморального иммунного ответа с ис-

пользованием псевдотипированных вирусоподобных частиц одного цикла. Данная технология безопасна и высокоэффективна. С использованием этого подхода получают вирусоподобные частицы, псевдотипированные поверхностным гликопротеином исследуемого вируса, при этом подобные частицы не способны к репликации, что обеспечивает высокую степень безопасности работы.

В ходе работы по получению рабдовирусных и лентивирусных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином (GP) вируса Эбола, на первом этапе была сформирована коллекция плазмид, кодирующих поверхностные белки представителей рода Эболавирус. Для этого проведен анализ доступных геномов вируса, представленных в базе данных GenBank, и выбраны последовательности, кодирующие GP штаммов: *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus*, *Bombali ebolavirus*. Синтез нуклеотидных последовательностей GP осуществлен коммерческой фирмой (ДНК-синтез, Москва). Соответствие нуклеотидной последовательности подтверждено секвенированием. Последовательности были клонированы в составе коммерчески доступного вектора рh. Для анализа функциональности полученными плазмидами трансфецировали клетки НЕК293FT. Способность к трансдукции полученных частиц оценивали при помощи панели культур клеток млекопитающих, в среднем она составила порядка 200000 RLU.

**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ АССОЦИАЦИИ
ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА С РИСКОМ РАЗВИТИЯ
ОНКОПАТОЛОГИЙ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ ***

**ANALYSIS OF THE RESULTS OF STUDIES OF THE ASSOCIATION
OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS WITH THE RISK OF DEVELOPING
ONCOPATHOLOGIES OF VARIOUS LOCALIZATIONS**

М. К. Ибрагимова, Е. В. Кокорина, М. М. Цыганов, Н. В. Литвяков

*Научно-исследовательский институт онкологии
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН*

M. K. Ibragimova, E. V. Kokorina, M. M. Tsyganov, N. V. Litviakov

Cancer Research Institute, Tomsk NRMC

E-mail: imk1805@yandex.ru

Аннотация

В настоящий момент малочисленны работы, где внимание уделяется вопросу изучения влияния вируса папилломы человека (ВПЧ) на развитие таких онкопатологий, как рак легкого, рак молочной железы, рак яичника и т. д. Обсуждаются пути инфицирования, возможные молекулярные механизмы злокачественной трансформации с участием ВПЧ и значение инфицированности для тактики лечения больных. Однако данный вопрос остается открытым.

Abstract

At the moment, in a small number of works, attention is paid to the study of the influence of the human papillomavirus (HPV) on the development of such oncopathologies as lung cancer, breast cancer, ovarian cancer, etc. The pathways of infection, possible molecular mechanisms of malignant transformation involving HPV and the importance of infection for the treatment of patients are discussed. But one way or another, this question remains open.

Актуальность работы

Основной эпидемиологической особенностью ВПЧ-инфекции является широкое распространение. На протяжении всей жизни 8 из 10 человек инфицируются данным вирусом, и у 2–9 % из них ВПЧ-инфекция персистирует, приводя к онкологическим заболеваниям.

Целью данной работы является анализ мировых литературных данных распространенности ВПЧ у больных с наличием злокачественных новообразований (ЗНО) толстого кишечника, гортани и ротоглотки, молочной железы, легкого и яичника.

Материалы и методы

Был проведен поиск на глубину 26 лет по базам данных PubMed и Web of Science. Проведен мета-анализ распространенности ВПЧ при помощи программы Comprehensive Meta-Analysis 3.0. В таблице приведены данные, включенные в исследование.

Данные для проведения мета-анализа распространенности ВПЧ при ЗНО пяти локализаций

Локализация	Количество публикаций, включенных в мета-анализ	Количество образцов опухолевого материала	Количество образцов нормальной ткани
Колоректальный рак (КРР)	19	2049	830
Рак гортани и ротоглотки	28	4381	2345
Рак молочной железы (РМЖ)	29	2446	1144
Рак легкого (РЛ)	30	2916	1487
Рак яичников (РЯ)	29	2173	872

Результаты исследования

Частота инфицированности ВПЧ в опухоли при КРР составила 16 %, в нормальной ткани — 3 %. Результирующий относительный риск (RR) развития КРР при ВПЧ-инфекции составил $RR(95\% CI) = 2,97(1,42-6,22)$ при $p = 0,0039$ (рис. 1).

Study name	Statistics for each study				
	Risk ratio	Lower limit	Upper limit	Z-Value	p-Value
B. McGregor, 1993, USA [31]	4,27	1,08	16,82	2,08	0,04
J.Y. Cheng, 1995, Taiwan [27]	9,88	0,65	149,40	1,65	0,10
Y.M. Lee, 2001, Taiwan [24]	1,35	0,88	2,06	1,37	0,17
H.G. Yu, 2002, China [32]	5,50	1,32	22,86	2,35	0,02
A.L. Cavatorta, 2004, Argentina [33]	0,33	0,02	7,24	-0,70	0,48
S. Bodaghi, 2005, USA [34]	11,20	0,74	170,01	1,74	0,08
L.O. Perez, 2005, Argentina [35]	45,65	2,91	716,95	2,72	0,01
D.C. Damin, 2007, Brazil [36]	50,97	3,18	816,45	2,78	0,01
V. Miiello, 2009, Italy [37]	0,39	0,06	2,63	-0,97	0,33
T. Salepci, 2009, Turkey [28]	53,84	3,43	845,18	2,84	0,00
M.C. Gornick, 2010, Israel, Spaine, USA [21]	0,05	0,00	1,15	-1,87	0,06
F. Liu, 2011, China [38]	22,11	1,39	351,13	2,19	0,03
A.N. Burnett-Hartman, 2011, USA [39]	0,06	0,00	1,52	-1,70	0,09
S. Toru, 2012, Turkey [40]	5,61	0,32	97,48	1,18	0,24
A.N. Burnett-Hartman, 2013, USA [41]	4,54	0,27	76,09	1,05	0,29
H. Taherian, 2014, Iran [42]	0,33	0,01	7,99	-0,88	0,50
E. Tanzi, 2015, Italy [43]	1,80	0,64	5,04	1,12	0,26
R.D. Bernabe-Dones, 2016, USA [44]	15,20	2,14	108,18	2,72	0,01
L. Vuitton, 2017, France [45]	0,32	0,01	7,88	-0,69	0,49
	2,97	1,42	6,22	2,89	0,00

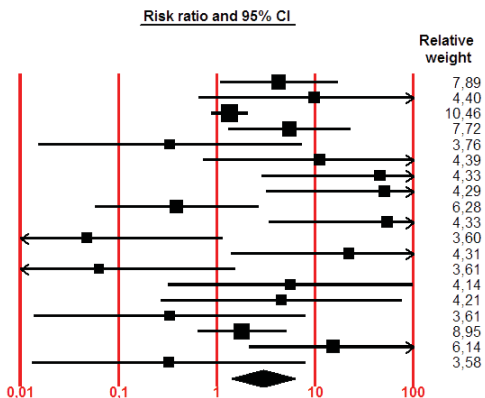


Рис. 1. Результаты метаанализа частоты инфицированности ВПЧ при КРР

Показана высокая частота инфицированности ВПЧ карцином головы и шеи — 40,8 % (1,6–100 %). Установлено, что чаще всего вирус обнаруживался при раке полости рта (54 %), гортани (50 %) и ротоглотки (39 %).

Распространенность ВПЧ в опухолевой ткани молочной железы составила 25 % при инфицированности 4,5 % в нормальной ткани. Показатель относительного риска развития РМЖ при ВПЧ-инфекции составил RR (95 % CI) = 3,6(2,3–5,6), при $p = 2,82 \times 10^{-8}$.

Результирующий относительный риск развития РЛ при ВПЧ составил RR (95 % CI) = 3,49(2,43–5,01) при $p = 0,000001$. Распространенность ВПЧ

в опухолевой ткани РЛ составила 28,7 % при инфицированности 7,3 % в нормальной ткани (рис. 2).

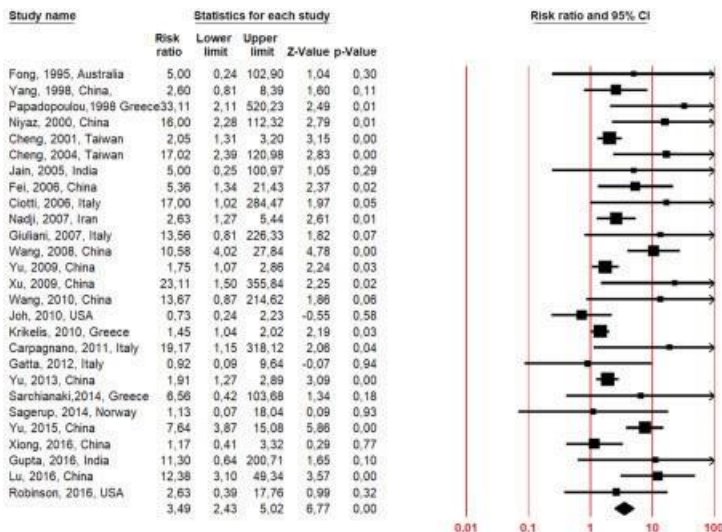


Рис. 2. Результаты метаанализа частоты инфицированности ВПЧ при РЛ

Выявлено, что распространенность ВПЧ в опухолевой ткани яичника составила 22,4 % при показателе инфицированности 9,5 % в нормальной ткани.

Выводы

Необходимо отметить значительный относительный риск развития РЛ, гортани и ротоглотки, КРР, РМЖ и РЯ при наличии инфицирования ВПЧ. Это еще раз доказывает важность своевременного мониторинга папилломавирусной инфекции и подчеркивает необходимость дальнейшего включения ВПЧ-вакцинации в Национальный календарь профилактических прививок.

N-АЦИЛГИДРАЗОНЫ КАМФОРЫ И ФЕНХОНА В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ВИРУСА HANTAAN ВЫЗЫВАЮЩЕГО ГЛПС*

CAMPHOR AND FENCHONE N-ACYLHYDRAZONES AS INHIBITORS OF HANTAAN VIRUS CAUSING HFRS

К. С. Ковалева¹, О. И. Яровая¹, А. В. Зайковская², Д. Н. Щербаков²,
О. В. Пьянков², Ф. И. Зубков³, Н. Ф. Салахутдинов¹

¹Новосибирский институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

²Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

³Российский университет дружбы народов, Москва

K. S. Kovaleva¹, O. I. Yarovaya¹, A. V. Zaykovskaya²,
D. N. Shcherbakov², O. V. Pyankov², F. I. Zubkov³, N. F. Salakhutdinov¹

¹N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk

²State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

³RUDN University, Moscow

E-mail: kseniya.kovaleva3103@yandex.ru

Аннотация

Синтезированы новые конъюгаты природных монотерпенов (+)-камфоры и (–)-фенхона с эпоксиизоиндолами, содержащими карбоксильную функцию. Для синтезированной библиотеки был проведен первичный скрининг в отношении вируса Хантаан и найдены его эффективные ингибиторы.

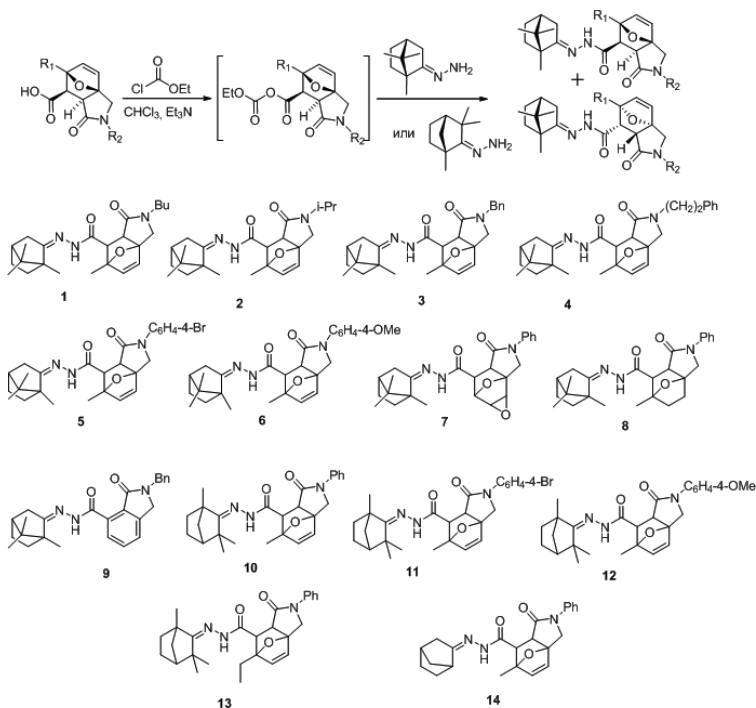
Abstract

New conjugates of natural monoterpenes (+)-camphor and (–)-fenchone with epoxyisoindoles containing a carboxyl function have been synthesized. For the synthesized library, an initial screening for the Hantaan virus was carried out and its effective inhibitors were found.

© К. С. Ковалева, О. И. Яровая, А. В. Зайковская, Д. Н. Щербаков, О. В. Пьянков, Ф. И. Зубков, Н. Ф. Салахутдинов, 2020

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 18-03-00271.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом — острое вирусное природно-очаговое заболевание, характеризующееся системным поражением организма. Возбудитель ГЛПС относится к семейству буньявирусов и принадлежит к роду *Hantavirus*. Несмотря на тяжесть протекания этой болезни и широкое распространение, на сегодняшний день нет агентов, обладающих специфической активностью к вирусам, вызывающим ГЛПС. Среди различных соединений, содержащих триметилбицикло[2.2.1]гептановую группировку, известны ингибиторы вирусов гриппа [1, 2], вируса Марбург [3], оспы [4, 5] и др. В представленной работе были синтезированы конъюгаты камфоры и фенхона с эпоксиизоиндолами, содержащими карбоксильную функцию. Из (+)-камфоры и (–)-фенхона были получены гидразоны, далее по отработанной методике проводилась реакция карбоновых кислот с этилхлороформиатом и Et_3N с последующим введением *in situ* в реакцию гидразонов камфоры и фенхона. Предложенный подход позволял выделять целевые соединения **1–14** с высокими выходами в виде смеси диастереомеров.



Для синтезированной библиотеки N-ацилгидразонов **1–14** был проведен первичный скрининг в отношении вируса Хантаан. Скрининг был проведен коллегами из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Среди исследованных производных было обнаружено соединение-лидер **10**, ингибирующее вирус в концентрации 4 мкг/мл и обладающее SI = 230. Данные соединения обладают высоким потенциалом для дальнейших исследований и создания новых противовирусных препаратов.

Литература

1. Sokolova A., Yarovaya O., Baev D., Shernyukov A., Shtro A., Zarubaev V., Salakhutdinov N. // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. Vol. 127. P. 661.
2. Sokolova A., Yarovaya O., Semenova M., Shtro A., Orshanskay Y., Zarubaev V., Salakhutdinov N. // *Med. Chem. Commun.* 2017. Vol. 8. P. 960.
3. Kononova A., Sokolova A., Cheresiz S., Yarovaya O., Nikitina R., Chepurnov A., Pokrovsky A., Salakhutdinov N. // *Med. Chem. Commun.* 2017. Vol. 8. P. 2233.
4. Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Bormotov N. I., Shishkina L. N., Salakhutdinov N. F. // *Med. Chem. Commun.* 2018. Vol. 9. P. 1746.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КЛОНОВЫХ ВАРИАНТОВ ШТАММА ЛИВП ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

RESEARCH PROPERTIES OF CLONE VARIANTS OF STRAIN LIVP OF VACCINIA VIRUS

Ю. В. Коняхина, И. В. Колосова, А. А. Сергеев, С. Н. Щелкунов

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

Y.V.Konyakhina, I.V.Kolosova, A.A.Sergeev, S.N.Shchelkunov

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: iuliakonyahina@yandex.ru

Аннотация

В исследовании представлены данные получения клоновых вариантов штамма ЛИВП вируса осповакцины, сравнительного исследования динамики их роста на культуре клеток CV-1. На основании этих данных выбран клон № 1 (LIVP-1) для оценки его свойств при интраназальном заражении мышей линии Balb/C. Выполнены эксперименты по оценке динамики накопления LIVP-1 в легких мышей в течение 14 суток после заражения. Определены кривые изменения массы тела и массы легких интраназально инфицированных животных. Проводятся эксперименты по адаптации LIVP-1 к размножению в легких мышей.

Abstract

The study presents data on obtaining clonal variants of the LIVP strain of the vaccinia virus, a comparative study of the dynamics their growth on CV-1 cell culture. Based on these data clone №1 (LIVP-1) was selected to evaluate its properties during intranasal infection of Balb/C mice. Experiments were performed to evaluate the dynamics of LIVP-1 accumulation in the lungs of mice within 14 days after infection. Curves of changes in body weight and lung weight of intranasally infected animals were determined. The experiments are being conducted to adapt LIVP-1 to reproduction in the lungs of mice.

Цель работы — получение клоновых вариантов вируса осповакцины, оценка их свойств при росте в культуре клеток, выбор наиболее инфекционного клона для дальнейшей адаптации на животных. Перед этапом пас-

сирования вируса осповакцины на животных с целью вероятного изменения генотипа нами было проведено клонирование исходного вируса через бляшку дважды под агарозой и один раз методом предельных разведений. Получение клоновых вариантов вируса осповакцины необходимо для того, чтобы взятый нами для работы клон был однороден, имел конкретное количество пассажей и известную нуклеотидную последовательность генома.

Для получения клоновых вариантов был взят вирус осповакцины (ВОВ), штамм ЛИВП. Первое клонирование вируса ВОВ, штамм ЛИВП, проводили через бляшку на монослое клеток под легкоплавкой агарозой. В результате было отобрано несколько вирусных клонов. После 1-го клонирования заражали культуральные флаконы 25 см² выделенными клонами, определяли их титры. Второе клонирование, которое проводили методом предельных разведений, и третье клонирование осуществляли через бляшку под легкоплавкой агарозой.

После получения трех клоновых вариантов вируса осповакцины определяли динамику их роста на монослое культуры клеток CV-1 в сравнении с исходным ВОВ, штамм ЛИВП. Монослой культуры клеток CV-1 инфицировали с множественностью заражения 0,01 БОЕ/мл. Динамику роста каждого варианта вируса оценивали через 0, 24, 48, 72 ч после заражения. Клон № 1 (LIVP-1) был выбран для дальнейшего пассирования и адаптации к животным.

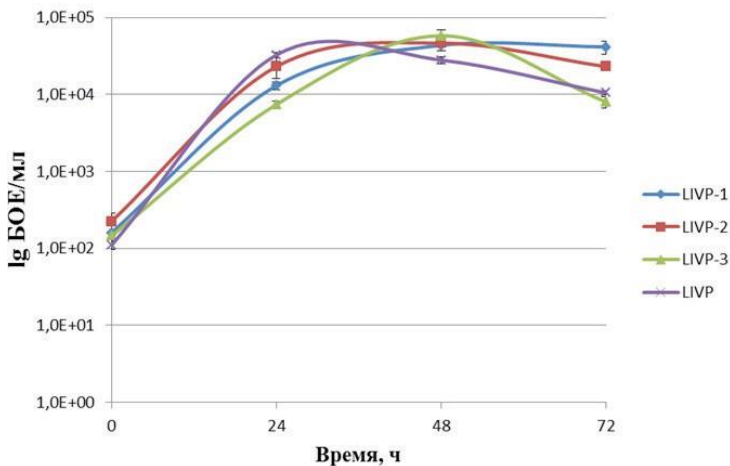


Рис. 1. Динамика роста клоновых вариантов ВОВ в культуре клеток CV-1

Динамику накопления вируса в легких после интраназального заражения (доза — 3×10^6 БОЕ/мышь) оценивали на мышах линии BALB/c массой тела 14–18 г. Через каждые 2, 4, 6, 8, 10 суток эвтаназировали по 3 мыши методом цервикальной дислокации, вскрывали, извлекали легкие, из которых получали гомогенаты. В гомогенатах легких определяли концентрацию/титр вируса методом бляшек на монослой культуры клеток CV-1.

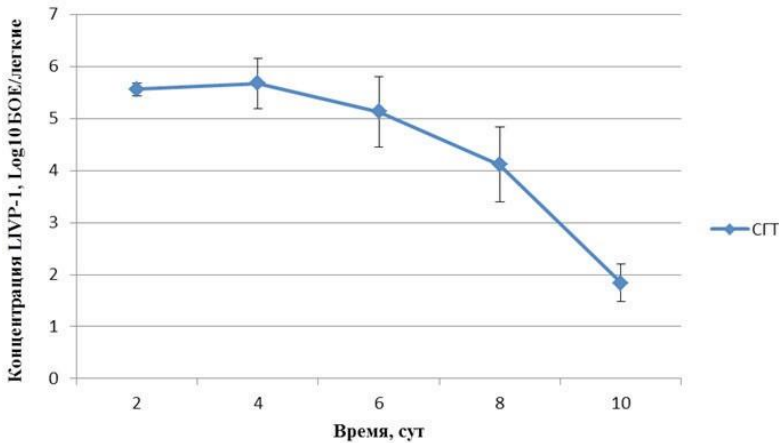


Рис. 2. Динамика накопления ВОВ L1VP-1 в легких мышей, БОЕ/легкие

При определении динамики накопления клона L1VP-1 в легких мышей отмечается тенденция к снижению количества вируса в легких после 4 суток, вплоть до минимально определяемого уровня на 10 сутки. В связи с этим оптимальным сроком для извлечения легких для приготовления гомогенатов и дальнейшего пассирования вируса являются 3–4 сутки, когда концентрация вируса в легких достигает максимального уровня до начала элиминации вируса из легких.

**ПРОБЛЕМА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
ВИРУСОВ ПТИЦ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**THE PROBLEM OF REPRESENTING GENETIC DIVERSITY
OF BIRD VIRUSES CIRCULATING IN RUSSIAN FEDERATION**

Д. Ю. Лепехина, Е. М. Харитонова, В. Ю. Лага

*Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина*

D. Yu. Lepekhina, E. M. Kharitonova, V. Yu. Laga

*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology —
MVA named after K. I. Skryabin*

E-mail: lepdauri@gmail.com

Аннотация

Определение филогенетических связей между представителями распространяющихся вирусных инфекций птиц является одной из актуальных задач современной эпизоотологии ввиду экономической и здравоохранительной значимости данного вопроса. Это позволяет оценивать динамику и предсказывать течения возможных панзоотий, а также способствует разработке методов противоэпизоотологических мероприятий.

Abstract

Determination of phylogenetic relationships between representatives of spreading viral infections of birds is one of the urgent tasks of modern epizootology due to the economic and public health significance of this issue. It makes possible to assess the dynamics and predict the course of potential panzootics, and also contributes to the development of methods of antiepizootic measures.

Введение

В мире на сегодняшний день циркулируют различные вирусы птиц. Самым известным является вирус гриппа птиц, он приносит значимый экономический ущерб птицеводству и влияет на здоровье людей. Тем не менее

прочие вирусные заболевания также вносят свой вклад в эпизоотологическую картину и требуют глубокого изучения.

Материалы и методы: база данных нуклеотидов GenBank®, MEGAX© software — филогенетический анализ методом максимального правдоподобия.

Результаты

Анализ ресурсов GenBank® демонстрирует неравномерную представленность сиквенсов вирусных геномов. Наиболее часто публикуемыми являются последовательности вирусов птичьего гриппа и ротавирусной инфекции.

Данные о представленности геномов вирусов птиц в базе GenBank®

Возбудитель	Болезнь	Количество полных геномов	Количество частичных геномов	Количество российских образцов
Influenza virus A	Птичий грипп	28 196	27 541	873
Avian encephalomyelitis virus, Tremovirus A	Вирус энцефаломиелимита птиц	6	74	1
Avian pneumovirus (APV)	Пневмовирус кур	0	15	0
Gallid alphaherpesvirus 2	Болезнь Марека (нейролимфоматоз, паралич птиц)	35	547	3
Paramixovirus PMV-1, Newcastle disease virus, NDV	Болезнь Ньюкасла (псевдочума птиц)	1 385	7 107	151
Infectious bursal disease virus, IBD	Инфекционная бурсальная болезнь (болезнь Гамборо, инфекционный нефрозо-нефрит)	92	4 683	65
Rotavirus A	Ротавирусная инфекция птиц	20 521	36 147	2 832
Duck enteritis virus	Вирусный энтерит утят	11	114	0

Возбудитель	Болезнь	Количество полных геномов	Количество частичных геномов	Количество российских образцов
Egg-drop syndrome-76 aviadeno-virus, EDS-76	Синдром снижения яйценоскости, ССЯ-76	18	29	0
Chicken anemia virus, CAV	Инфекционная анемия цыплят, синдром дерматоподобной анемии, «синее крыло»	226	579	4
Avian leukosis virus, ALV	Лейкоз птиц	188	1087	4
Avian infectious bronchitis virus, avian coronavirus, IBV	Инфекционный бронхит	409	7 397	176

Для обоснования важности проведения молекулярно-генетического анализа геномов вирусов птиц использовался пример вируса болезни Ньюкасла. Последовательности гена белка слияния (F), выделенные с территории России, кластеризовались с аналогичной последовательностью из Ирландии, а не с последовательностями из Украины или Средней Азии, как можно было бы ожидать.

Вывод

Для воссоздания наиболее полной картины филогенетических связей между мировыми и российскими штаммами вирусов птиц необходима более обширная представленность последовательностей вторых в международных базах данных.

ХАРЕКТРИЗАЦИЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО
МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА *IN VIVO*

CHARACTERIZATION OF NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODY
AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS *IN VIVO*

А. Л. Матвеев¹, Л. Е. Матвеев¹, О. В. Стронин², И. К. Байков¹,
Л. А. Емельянова¹, Я. А. Ключевич¹, Н. В. Тикунова¹

¹Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
²Научно-производственное объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам «Микроген», Москва

A. L. Matveev¹, L. E. Matveev¹, O. V. Stronin², I. K. Baykov¹,
L. A. Emeljanova¹, Ya. A. Khlusevich¹, N. V. Tikunova¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

²Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, Moscow

E-mail: guterus@gmail.com

Аннотация

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является наиболее важным патогеном, переносимым клещами в семействе *Flaviviridae* и вызывает одну из самых тяжелых нейроинфекций человека. В данном исследовании у нейтрализующего мышиноного моноклонального антитела (мкАТ) 14D5, которое ранее показало кросс-реактивное связывание с несколькими флавивирусами, принадлежащими к группе клещевого энцефалита, были изучены профилактические и терапевтические свойства у мышей BALB/c, инфицированных ВКЭ. До и после заражения мышам вводили мкАТ 14D5 в дозах 100 мкг и 10 мкг на мыш. Моноклональное антитело 14D5 продемонстрировало высокую защитную эффективность при введении в высокой дозе через один день после заражения, причем выживаемость была зависима от дозы ВКЭ. Профилактическое введение мкАТ 14D5 было более эффективным, чем постконтактное введение; полная защита была продемонстрирована, когда мкАТ вводили за один день до заражения. Кроме того, защитная эффективность мкАТ 14D5 была значительно выше, чем у сыровороточного противоклещевого иммуноглобулина. Однако

никакой защиты не наблюдалось у мышей, получавших низкую дозу мкАТ 14D5 независимо от времени введения мкАТ и дозы ВКЭ. Также была исследована способность мкАТ 14D5 опосредовать ВКЭ-инфекцию у мышей, и результаты показали, что мкАТ 14D5 не усиливает TBEV-инфекцию независимо от времени введения мАб. Был локализован нейтрализующий эпитоп мкАТ 14D5, он находится в 3 домене гликопротеина Е ВКЭ в области между 301–339 аминокислотными остатками, причем этот участок 3 домена является высококонсервативным среди флавивирусов из группы клещевого энцефалита.

Abstract

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the most important tick-transmitted pathogen in the family Flaviviridae and causes one of the most severe human neuroinfections. In this study, a neutralizing mouse mAb 14D5, which was previously shown to have cross-reactive binding to several flaviviruses belonging to the TBEV group, was examined for its prophylactic and therapeutic effects in BALB/c mice infected with TBEV. Before and after infection, mice were administered mAb 14D5 at doses 100 µg and 10 µg per mouse. mAb 14D5 showed clear protective efficacy when injected at the high dose one day after infection, with survival rates that were TBEV dose-dependent. Prophylactic administration of mAb 14D5 was more effective than post-exposure administration and complete protection was documented when the mAb was administered one day before infection. The protective efficacy of mAb 14D5 was significantly higher than that of the anti-TBE serum immunoglobulin. However, no protection was observed in mice received the low dose of mAb 14D5 independent of the timing of mAb injection and TBEV dose. The ability of species-matched mAb 14D5 to mediate TBEV infection in mice was also investigated, and the results indicated that mAb 14D5 did not augment TBEV infection independent of the time of mAb administration. The neutralizing epitope for mAb 14D5 was localized in domain III of glycoprotein E of TBEV in a region between residues 301–339, which is conserved among flaviviruses from the TBEV group.

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В АГРОБИОЦЕНОЗЕ КАРТОФЕЛЬНОГО ПОЛЯ

VIRAL INFECTIONS CIRCULATION IN THE POTATO FIELD AGROBIOCENOSIS

Н. В. Мацишина, О. А. Собко, П. В. Фисенко, И. В. Ким

*Федеральный научный центр агробιοтехнологии Дальнего Востока
им. А. К. Чайки, Уссурийск*

N. V. Matsishina, O. A. Sobko, P. V. Fisenko, I. V. Kim

*Far East Federal Research Center of agrobiotechnology
named after A. K. Chaika, Ussuriysk*

E-mail: mnathalie134@gmail.com

Аннотация

Одним из важнейших факторов, влияющих на урожайность картофеля, являются вирусные инфекции. В 2020 г. была выявлена эпифитотия вирусов картофеля. По данным ИФА было выявлено значительное заражение посадок картофеля PVY, PVS, PVM. В собранных методом ПЦР насекомых выявили PVY (100 % встречаемости у лугового клопа и 50 % у картофельной коровки), PVX (50 % у картофельной коровки), PLRV (50 % у клопа и 25 % у коровки), PVM (75 % у всех векторов), PVS (100 % у клопа). Методом ИФА в сорной растительности были определены следующие вирусы: PVS у *Matricaria inodora var. agrestis* Weiss, PVY и PLRV — *Sonchus arvensis*. Таким образом, на примере картофельного поля выявлены все этапы циркуляции вирусов в агробиоценозе.

Abstract

Viral infections are one of the most important factors affecting potato yield. In 2020, the epiphytoty of potato viruses was detected. According to EIA data, a significant infection of potato plantings with PVY, PVS, PVM was detected. In the collected insects, the PCR method identified PVY (100 % occurrence in the meadow bug and 50 % for the 28-punctata potato ladybug), PVX (50 % for the 28-punctata potato ladybug), PLRV (50 % for the meadow bug and 25 % for the ladybug), PVM (75 % for all vectors), PVS (100 % for the meadow bug). The following viruses were identified by ELISA in weeds: PVS in *Matricaria inodora var. agrestis* Weiss, PVY and PLRV — *Sonchus arvensis*. Thus, using the example of a potato field, all stages of the viruses circulation in the agrobiocenosis were identified.

Viral infections are one of the most important factors affecting potato productivity [1]. Viruses are widespread in biocenoses and can infect a broad array of plant taxa, which allows them to survive in natural reserves. Plants infection is possible both by a contact method (plant-plant) — in thickened crops plantings, and by means of insect vectors. This is aggravated by the fact that viral plant infections cannot be treated with traditional chemical actors [2].

In 2020 on the entomophytopathological area of a challenge infection context, an epiphytoty of potato viruses was detected. Symptoms were noted visually and with photographs. To identify the infection type, potato leaves, weeds in the field vicinity and the most common insect pests (field bug *Lygus pratensis* L. and 28-punctata potato ladybug *Henosepilachna vigintioctomaculata* Motch.) were collected. ELISA was performed according to the standard method. Virus detection by PCR was carried out using the “Fitoscreen” series reagents kit produced by Synthol. The greatest manifestations of viral symptoms (4–5 points) were observed on plants with maximum damage by insects (2–3 points for the meadow bug, 1–2 points for the potato ladybug) in the early stages of the growing season. According to the ELISA data, a significant infection of potato plantings (53,85 % of experimental plants) with PVY, PVS, PVM was detected, the most common was Y-virus (100 %), while M and S-viruses were concomitant infections and were detected in 5,57 % of plants. In the collected insects, the PCR method revealed PVY (100 % occurrence in the meadow bug and 50 % for the potato ladybird), PVX (50 % for the potato ladybug), PLRV (50 % for the meadow bug and 25 % for the ladybug), PVM (75 % for all vectors), PVS (100 % for the meadow bug). The following viruses were identified by ELISA in weeds: PVS in *Matricaria inodora* var. *agrestis* Weiss, PVY and PLRV — *Sonchus arvensis*. It should be noted that wild camomile and field milk thistle are the fodder base for vectors in the absence of agricultural plantings. The revealed patterns of damage distribution and viral infection symptoms manifestation leave no doubt about the mechanisms of infection. The detection of viruses in weeds indicates their natural focal origin, their detection in phytophages — the path of spread.

Thus, using the example of a potato field, all stages of the viruses circulation in the agrobiocenosis were identified.

References

1. Rogozina E. V., Mironenko N. V., Chalaya N. A., Matsuhita Yu., Yanagisawa H. Potato mosaic viruses affecting tuber producing plants *Solanum* L. species in the field gene bank of VIR // Vavilov Journal of Genetics and Breeding 2019. Vol. 3. No. 23. P. 304–311.
2. Ryabtseva T. V., Kulikova V. I., Ilkevich O. G. Potato improvement by chemotherapy in culture in vitro // International research journal. 2015. No. 10. Part 3. P. 66–68.

УНИКАЛЬНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ВИЧ-1, ОБНАРУЖЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

UNIQUE RECOMBINANT VARIANTS OF HIV-1 DETECTED IN SVERDLOVSK REGION

Т. М. Налимова¹, Н. М. Гашникова¹, А. Н. Швалов¹,
А. В. Тотменин¹, Т. П. Сандарева², А. А. Поздеева²

¹ Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

² Свердловский областной центр профилактики
и борьбы со СПИД, Екатеринбург

T. M. Nalimova¹, N. M. Gashnikova¹, A. N. Shvalov¹,
A. V. Totmenin¹, T. P. Sandareva², A. A. Pozdeeva²

¹ State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo
² Sverdlovsk regional center of AIDS prevention and treatment, Ekaterinburg

E-mail: nalimova_tm@vector.nsc.ru

Аннотация

На территории Свердловской области доминирует распространение специфического российского субтипа А ВИЧ-1. При проведении молекулярно-биологических исследований ВИЧ-1 на данной территории были выявлены 6 генетических вариантов вируса с мозаичной структурой, схожей с CRF03_AB ВИЧ-1.

Выполненные в работе углубленный филогенетический и рекомбинационный анализы обнаруженных ВИЧ-1 доказали, что данные вирусы не могут быть отнесены к кластеру CRF03_AB, а являются уникальными ВИЧ-1, возникшими в результате отдельных рекомбинационных событий.

Abstract

Russian subtype A (A6) HIV-1 is predominately circulating on the territory of Sverdlovsk region. Molecular biological analysis of HIV-1 in this area revealed six genetic viral variants of the with a mosaic structure similar to HIV-1 CRF03_AB.

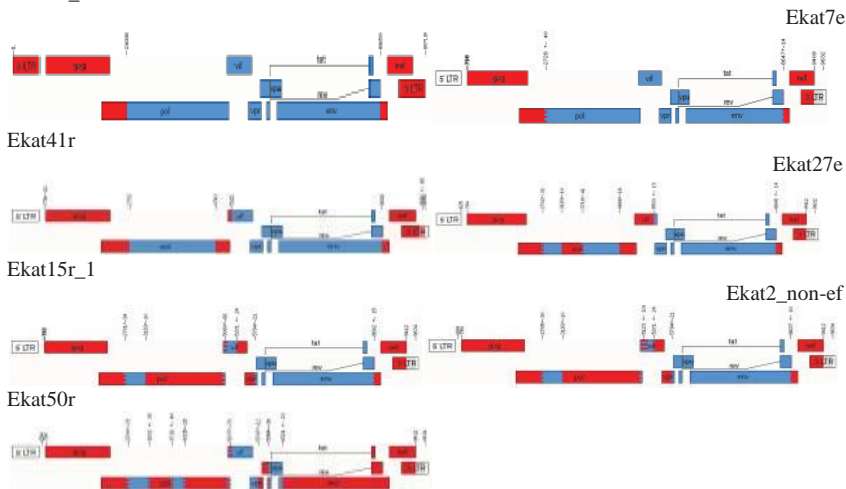
The in-depth phylogenetic and recombination analyses of those HIV-1 variants showed that these viruses represent novel HIV-1 variant emerged due to individual recombination events, and are not a part of the CRF03_AB cluster.

Мониторинг циркулирующих генетических вариантов является важным параметром характеристики формирования эпидемиологической картины распространения ВИЧ-1. Наблюдаемое увеличение вариабельности ВИЧ-1 за счет распространения новых рекомбинантных форм вируса может сказаться на качестве диагностики ВИЧ-инфекции.

Целью работы было генотипирование рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных в Свердловской области.

Исследовано 94 образца ВИЧ-1, собранных в Свердловской области в 2019 г. С использованием платформы MiSeq получены прочтения 19 геномов ВИЧ-1 длиной 8 622 п. н., которые включали все области генома, кроме повторяющихся последовательностей LTR и 26 фрагментов ВИЧ-1, содержащих 2/3 генома (6220 п. н.). Для 49 ВИЧ-1 исследованы гены *pol* и *gag*. При помощи онлайн-программы jrHMM установлено, что все шесть найденных уникальных рекомбинантных форм (URF) ВИЧ-1 и референсный геном CRF03_AB ВИЧ-1 содержат схожий участок рекомбинации в гене *pol* (2700 п. н. \pm 40). Из них 5 URF имеют еще один общий участок рекомбинации с CRF03_AB в области гена *env* ВИЧ-1 (8650 п. н. \pm 40) (см. рисунок). Для схожих участков геномов URF вируса и референсных геномов CRF03_AB, A и B ВИЧ-1 были построены отдельные филогенетические де-

CRF03_ABRef



Обозначения субтипов:



Референсный геном CRF03_AB
и 6 URF_A6B_ВИЧ-1 — jrHMM

ревья. Исследуемые фрагменты URF ВИЧ-1 кластеризовались с вирусами субтипов А и В, но не с CRF03_AB ВИЧ-1.

Среди исследованных URF только два варианта вируса статистически достоверно формировали одну филогенетическую подветвь, подтверждая эпидемическую связь пациентов-доноров ВИЧ, оставшиеся фрагменты URF ВИЧ-1 располагались на отдельных ветвях генетических кластеров А и В.

Выводы

При проведении молекулярно-генетического скрининга на территории Свердловской области из 94 образцов ВИЧ-1, выделенных от ВИЧ-инфицированных жителей, 93 % ВИЧ-1 принадлежали субтипу А ВИЧ-1 (подсубтип А6). В 7 % были обнаружены и описаны новые URF ВИЧ-1.

Углубленный филогенетический анализ доказал различное происхождение найденных шести вариантов URF ВИЧ-1, образованных в результате отдельных рекомбинационных событий. Выявленные ВИЧ-1 отнесены к новым уникальным формам URF А6В ВИЧ-1.

**МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МАКРОФАГОВ
МУЛЬТИГЕННЫМ СЕМЕЙСТВОМ MGF110
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ ***

**MODULATION OF HOST GENE EXPRESSION BY AFRICAN SWINE
FEVER VIRUS MULTIGENIC FAMILY 110**

М. В. Нефедьева, И. А. Титов

*Федеральный исследовательский центр вирусологии
и микробиологии, пос. Вольгинский*

M. V. Nefedeva, I. A. Titov

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Volginsky

E-mail: masha67111@mail.ru

Аннотация

Функциональная аннотация генома вируса африканской чумы свиней (АЧС) остается загадкой. В данной работе (использовался рекомбинантный вирус АЧС с делецией участка MGF 110 (АЧСΔMGF110) и секвенированием РНК с последующим анализом дифференциальной экспрессии генов) мы впервые показали регуляцию генов макрофагов свиней в первые часы после заражения вирусом. Индукция защитных механизмов клеточного противовирусного ответа при заражении рекомбинантным вирусом АЧСΔMGF110 делает его перспективным вакцинным кандидатом.

Abstract

The genome functional annotation of the African swine fever virus (ASFV) remains a mystery. Here, using recombinant ASFV with deletion MGF 110 region (ASFV ΔMGF110) and RNA sequencing with following differential gene expression analysis we studied the swine macrophages gene regulation at the first hours post infection. Noticed induction of intrinsic antiviral immune response after ASFV ΔMGF110 infection, suggests its strong protective potential as a vaccine candidate.

В странах с развитым свиноводством вирус АЧС имеет негативные социально-экономические последствия из-за отсутствия эффективной вак-

© М. В. Нефедьева, И. А. Титов, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00216.

цины. Анализ аттенуированных штаммов показал отличия в составе вариативных областей генома, а функции представителей большинства мультигенных семейств MGF остаются неизвестными.

В данной работе мы постарались выяснить роль генов MGF110 вируса АЧС в индукции внутриклеточного иммунного ответа у свиней.

На основе вирулентного штамма Волгоград/14с методом гомологичной рекомбинации был сконструирован химерный вирус АЧС с делецией 14 генов (6040–13603) MGF110. Различий в кинетике репликации между исходным вирусом и АЧСΔMGF110 при заражении клеточной линии COS-1 не выявлено.

Для проведения РНК-секвенирования и анализа дифференциальной экспрессии генов через 6 часов после заражения макрофагов свиней вирусом АЧСΔMGF110 и Волгоград/14с с множественностью заражения 0,1 была выделена тотальная РНК с использованием Trizol LS и набора PureLink RNA Micro Kit. Анализ качества РНК проводили на Bioanalyzer2100. Библиотеки РНК приготовлены с использованием NEBNext® Ultra™ RNA II Library Prep Kit for Illumina® согласно инструкции. Полученные библиотеки были разведены по протоколам Illumina и секвенированы при помощи HiSeq2500, а чтения картированы на геном *Sus Scrofa* (ID84). Дифференциальная экспрессия генов вычислена на основе LogFC в сравнении с неинфицированной культурой клеток. Статистически достоверные значения ($p < 0,05$) были аннотированы с использованием geneontology.org.

В результате проведенных исследований было получено 1182892, 12144228 и 12520148 прочтений для АЧСΔMGF110, Волгоград/14с и неинфицированной культуры клеток макрофагов с картированием 10568758 (89,34 %), 11124249 (91,6 %) и 11467254 (91,59 %). Число дифференциально экспрессирующихся генов в макрофагах свиней через 6 часов после заражения составило 2079 для вируса АЧСΔMGF110 и 1525 для Волгоград/14с. Основные различия в уровне экспрессии при заражении АЧСΔMGF110 отмечены для генов, участвующих в агрегации нейтрофилов, регуляции продукции цитокинов, противовоспалительного иммунного ответа, положительной регуляции NK клеток и гидролазной активности. При заражении вирусом АЧС Волгоград/14с выявлены активная экспрессия генов, участвующих в клеточном ответе на ROS, продукции молекулярных медиаторов воспаления и продукции цитокинов и процессах катаболического окисления фосфолипидов.

Результаты исследований показывают, что клеточный иммунный ответ при заражении макрофагов вирусом АЧСΔMGF110 свидетельствует о его вакцинном потенциале и открывает дальнейшие перспективы практического применения.

МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПАРВОВИРУСНОЙ В19 ИНФЕКЦИИ

MEDICAL AND SOCIAL ASPECTS OF PARVOVIRUS B19 INFECTION

О. Н. Никишов, А. А. Кузин

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

O. N. Nikishov, A. A. Kuzin

Military Medical Academy named after S. M. Kirov, St. Petersburg

Аннотация

Парвовирусная инфекция (ПВИ) представляет собой одну из новых медико-биологических проблем, которая в основном разрабатывается специалистами в области вирусологии. Ее клинические проявления характеризуются наличием различных нозологических форм, что требует проведения дифференциальной диагностики как с другими вирусными инфекциями, так и с неинфекционными заболеваниями.

Abstract

Parvovirus infection (PVI) is one of the new biomedical problems, which is mainly developed by virology experts. Its clinical manifestations are characterized by the presence of various nosological forms, which requires differential diagnosis with both other viral infections and noncommunicable diseases.

Парвовирусная инфекция представляет собой одну из относительно новых проблем, которая входит в приоритетную область научных исследований вирусологии и инфектологии. Кроме детей разных возрастов, она может быть актуальна и для других социально значимых групп населения, прежде всего здоровых лиц из числа доноров крови и женщин, планирующих беременность. Согласно требованиям отечественных нормативных документов, в производстве лечебных препаратов из плазмы крови предполагается использование сырья, свободного от вирусов или с минимальной вирусной нагрузкой.

Парвовирус В19 человека является одним из контаминирующих агентов, передача которого может осуществляться парентерально, через препараты

крови или при трансплантации костного мозга и органов. Вирус поражает главным образом клетки — предшественники эритроцитов. Заболевание имеет широкий спектр проявлений. Тяжелыми осложнениями парвовирусной инфекции являются апластический криз, транзиторная анемия, парциальная красноклеточная аплазия костного мозга, фульминантный гепатит у иммунокомпрометированных лиц и людей с заболеваниями крови. Тяжелая форма заболевания развивается преимущественно у лиц с первичными иммунодефицитами различной этиологии. Вирус обладает также тератогенным действием и вызывает водянку плода при трансплацентарной передаче.

Известно, что ДНК парвовируса В19 может определяться в крови клинически здоровых людей длительное время — до трех лет и более после перенесенного заболевания. Частота обнаружения ДНК парвовируса в крови отечественных доноров составляет 1,0–1,9 %.

Вирус устойчив к стандартным режимам стерилизации гемопродуктов. Донация с вирусной нагрузкой 10^5 и выше копий/мл при пулировании приводит к заражению 50 % реципиентов.

Установлено, что клинические проявления заболевания развиваются у 0,12 % реципиентов, получивших препараты крови, содержащие PV В19. По данным белорусских исследователей, у пациентов с патологией кроветворных органов случаи парвовирусной инфекции равномерно распределены по сезонам года, в отличие от экзантемной формы заболевания в общей популяции, что может быть связано с парентеральным путем передачи инфекции. В ряде зарубежных стран исследование донорской крови на наличие ДНК PV В19 является обязательным; в нашей стране необходимость проведения такого скрининга обсуждается.

Таким образом, требуется дальнейшее проведение комплексного научно-практического исследования, направленного на изучение заболеваемости и показателей специфического противовирусного гуморального иммунитета в сопоставлении с клинико-эпидемиологическими проявлениями ПВИ среди разных групп населения, объединенных определенными социальными условиями, способными обеспечить реализацию передачи возбудителя.

Parvovirus infection is a relatively new problem that is a priority area of virology and infection research. In addition to children of different ages, it can be relevant for other socially significant populations, especially healthy blood donors and women planning pregnancy. According to the requirements of domestic regulations, in the production of therapeutic drugs from blood plasma is supposed

to use raw materials free from viruses or with minimal viral load. Parvovirus B19 person is one of the contaminant agents, the transmission of which can be carried out parenterally, through blood preparations or during transplantation of bone marrow and organs. The virus mainly affects cells — precursors of red blood cells. The disease has a wide range of manifestations. Severe complications of parvovirus infection are aplastic crisis, transient anemia, partial red-celled ap Severe complications of parvovirus infection are aplastic crisis, transient anemia, partial red-celled bone marrow aplasia, fulminant hepatitis in immunocompromised individuals and people with blood diseases. Severe form of the disease develops mainly in persons with primary immunodeficiency of various etiology. The virus also has a teratogenic effect and causes fetal water in transplacental transmission. It is known that the DNA of parvovirus B19 can be determined in the blood of clinically healthy people for a long time, up to three years or more, after the disease. The rate of detection of parvovirus DNA in the blood of domestic donors is 1,0–1,9 %. The virus is resistant to standard hemofood sterilization regimes. Donation with a viral load of 10⁵ and above copies/ml when bulletseed results in the infection of 50 % of recipients. It has been established that clinical manifestations of the disease develop in 0,12 % of recipients who received blood products containing PV B19. According to Belarusian researchers, in patients with blood-making organ pathology cases of parvovirus infection are evenly distributed for the seasons of the year, as opposed to the exantem form of the disease in the general population, which may be associated with parenteral transmission. In a number of foreign countries, the study of donated blood for the presence of PV B19 DNA is mandatory; in our country, the need for such screening is being discussed. Thus, a comprehensive scientific and practical study aimed at studying morbidity and indicators of specific antiviral humoral immunity in comparison with clinical and epidemiological manifestations of PVI among different populations, united by certain social conditions that can ensure the implementation of the transmission of the pathogen, is required.

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА,
ВЫДЕЛЕННЫХ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ**

**GENOTYPING OF VARIANTS OF THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS
ISOLATED IN THE NOVOSIBIRSK REGION**

И. П. Осипова¹, А. А. Селезнев², А. В. Тотменин¹,
А. Н. Швалов¹, М. П. Гашникова¹, Н. М. Гашникова¹

*¹ Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
² ИП Глава КФХ Турков В. Н., с. Покровка*

I. P. Osipova¹, A. A. Seleznev², A. V. Totmenin¹,
A. N. Shvalov¹, M. P. Gashnikova¹, N. M. Gashnikova¹

*¹ State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo
² IE Head of KFH Turkov V. N., Pokrovka village*

E-mail: osipova_ip@vector.nsc.ru

Аннотация

Впервые расшифрованы геномы вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) генотипа 4 и генотипа 7, выделенные на территории России. Изучены особенности их нуклеотидной и аминокислотной последовательностей.

Abstract

For the first time, the genomes of the bovine leukemia virus (BLV) of genotype 4 and genotype 7 have been decoded in Russia. The features of their nucleotide and aminoacid sequences have been studied.

Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) вызывает развитие злокачественного лимфопролиферативного заболевания коров. Высокая распространенность ВЛ КРС приводит к экономическому ущербу и потере генофонда ценных пород в хозяйствах. В международной базе данных от-

сутствует информация о последовательностях полных геномов вариантов ВЛ КРС, циркулирующих среди поголовья КРС в России.

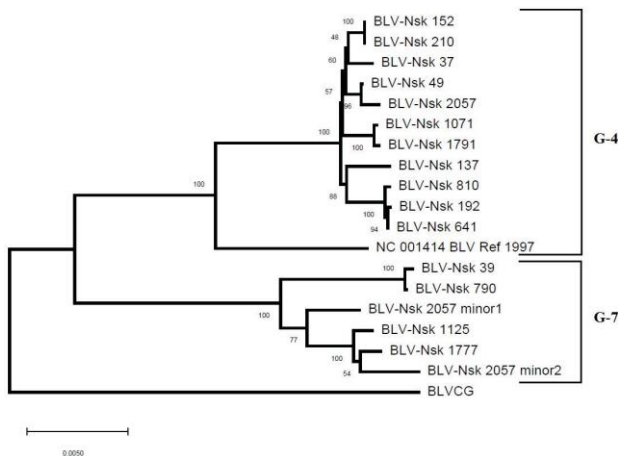
Цель исследования — изучить особенности последовательностей генома российских вариантов ВЛ КРС.

Материалы/методы

Исследовано 20 образцов крови от коров, имеющих предварительное серологическое подтверждение наличия ВЛ КРС. Из клеток крови была выделена суммарная клеточная ДНК. Получены фрагменты вирусного генома размером 7765 п. н., проведено их секвенирование с использованием платформы MiSeq IlluminaInc., выполнен филогенетический анализ, проведено множественное выравнивание последовательностей с использованием референсных штаммов ВЛ КРС, депонированных в GenBank.

Результаты

Для 15 из 20 исследованных образцов крови получены, расшифрованы и проанализированы нуклеотидные и аминокислотные последовательности почти полного генома ВЛ КРС (за исключением LTR). Филогенетический анализ позволил отнести 11 вирусов к генотипу 4, 6 вирусов к генотипу 7 (см. рисунок). В одном образце крови коровы выделено одновременно 3 отличающихся варианта ВЛ КРС, 2 из которых относятся к седьмому, а один — к четвертому генотипу. Выявлены аминокислотные отличия в области гена *env*, характерные для вариантов ВЛ КРС генотипа 4.



Филогенетическое дерево исследованных геномов ВЛ КРС

Выводы

В животноводческих хозяйствах Новосибирской области циркулирует не менее двух генетических вариантов ВЛ КРС — генотипа 4 и генотипа 7. Наблюдается суперинфекция коров, в том числе разными генотипами ВЛ КРС. Впервые расшифрованы геномы 17 вариантов вируса лейкоза коров, выделенных в России.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2),
ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В 2019–2020 ГГ. ***

**CHARACTERISTICS OF INFLUENZA A (H3N2)
VIRUSES CIRCULATING IN RUSSIA IN 2019–2020**

П. А. Петрова, Н. И. Коновалова,
А. Ю. Бояринцева, Д. М. Даниленко, М. Ю. Еропкин

*Научно-исследовательский институт гриппа
им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург*

P. A. Petrova, N. I. Konovalova, A. Yu. Boyarinцева,
D. M. Danilenko, M. Yu. Eroпкиn

Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg

E-mail: suddenkovapolina@gmail.com

Аннотация

Устойчивая циркуляция вирусов гриппа А(Н3N2) обусловлена их способностью быстро эволюционировать и избегать иммунного распознавания путем модификации поверхностных белков — гемагглютинаина и нейраминидазы. При таком высоком уровне изменчивости вирусов гриппа, имеющиеся вакцины не обеспечивают долговременной протекции. Состав ежегодно пересматривается экспертами Глобальной сети эпидемиологического надзора за гриппом ВОЗ и обновляется с учетом данных об антигенных и генетических особенностях штаммов. Антигенный анализ российских изолятов в сравнении со штаммами, циркулирующими в мире, позволяет наиболее точно определить эволюционные тенденции.

Abstract

The stable circulation of influenza A (H3N2) viruses is due to their ability to rapidly evolve and avoid immune recognition by modifying surface proteins — hemagglutinin and neuraminidase. With such a high level of variability in influenza viruses, these vaccines do not have long-term protection. Compiled annually reviewed by experts from the WHO Global Influenza Surveillance Network and updated based on the antigenic and genetic

© П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, А. Ю. Бояринцева, Д. М. Даниленко, М. Ю. Еропкин, 2020

* Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018).

characteristics of the strains. Antigenic analysis of Russian isolates, in comparison with strains circulating in the world, makes it possible to accurately determine evolutionary trends.

В последние годы вирусы гриппа А(Н3N2) социркулируют совместно с вирусами гриппа А(Н1N1)pdm09 и вирусами гриппа В. В рамках надзора за гриппом выделение вирусов гриппа на клеточных культурах является основной и важной задачей, поскольку дает возможность не только оценить их антигенные характеристики, но и выявить соответствие циркулирующих среди населения штаммов вирусам, включенным в состав вакцин.

Для антигенного анализа циркулирующих вирусов А(Н3N2) используются такие методы, как реакция торможения гемагглютинации (РТГА) и реакция нейтрализации, выполненная методом микрокультурального ИФА cell-ELISA (МН). В 2019–2020 гг. было проанализировано 97 штаммов, выделенных в г. Санкт-Петербурге и полученных из Базовых вирусологических лабораторий. В отличие от трех предыдущих сезонов 2016 — 2019 гг., в последнем сезоне большинство изолятов А(Н3N2) сохраняли гемагглютинирующий титр в присутствии 20 нМ раствора озельтамивира карбоксилата, поэтому антигенный анализ в основном был проведен в РТГА.

Часть вирусов данного подтипа была протестирована как в РТГА, так и в МН. Результаты параллельного тестирования штаммов в РТГА и РН показали идентичность данных антигенного анализа, полученных обоими методами.

Большая часть изученных вирусов (95,9 %) данного подтипа в прошедшем сезоне была антигенно родственна эталонному штамму А/Сингапур/INFIMH-0016-19/2016 и реагировала с антисывороткой, полученной к клеточной разновидности данного штамма до 1/2–1/8 гомологичного титра. Только в трех городах (Санкт-Петербург, Калининград, Омск) изолированы единичные вирусы (4,1 %), подобные А/Канзас/14/17, — штамму, введенному в состав вакцин на 2019–2020 эпидемический сезон. Представители данных антигенных и генетических групп по своим свойствам существенно отличались друг от друга. В результате этого протективность гриппозных вакцин по компоненту А(Н3N2) была существенно снижена, как это было показано в наблюдениях в системе сигнального надзора, поскольку вирусы, подобные А/Канзас/14/2017, не получили распространения в России в прошедшем сезоне. Также можно отметить, что большинство изолятов относились к генетической и антигенной группе 3С.2а1b и взаимодействовали с референс-штаммами данного клайда — А/Ла Риоха/2202/18, А/С. Петербург/RII-475/18 до 1–1/4 гомологичного титра.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*

PROSPECTS FOR USING *VIBRIO CHOLERAЕ* BACTERIOPHAGES

М. П. Погожова, Н. Е. Гайевская, А. О. Аноприенко

*Ростовский-на-Дону научно-исследовательский
противочумный институт*

M. P. Pogozhova, N. E. Gayevskaya, A. O. Anoprienko

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute

E-mail: m_pogozheva@mail.ru

Аннотация

Во всем мире *V. cholerae* приобретает все большую устойчивость к противомикробным препаратам. Антибиотикорезистентные бактерии спровоцировали интерес к альтернативным методам терапии. В России и за рубежом специалисты вновь стали обращать внимание на бактериофаги с позиции оценки не только диагностики ряда заболеваний, но и их биологического потенциала при лечении и профилактике. Использование современных молекулярно-генетических методов исследования, включая анализ генома холерных фагов, для решения ряда фундаментальных и прикладных задач продолжает оставаться актуальным, позволяя доказать отсутствие ряда генетических детерминант умеренности, что определяет пригодность фага для конструирования диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

Abstract

In the whole world, *V. cholerae* is gaining increasing resistance to antimicrobial drugs. Antibiotic-resistant bacteria have sparked interest in alternative therapies. In Russia and abroad, specialists again began to attend to bacteriophages from the standpoint of assessing their biological potential in the treatment, prevention, and diagnosis of various diseases. The use of molecular genetic methods, including analysis of the genome of cholera phages for solving fundamental and applied problems, continues to be relevant, allowing one to prove the absence of a number of genetic determinants of temperance, which will determine the suitability of the phage for the design of diagnostic and therapeutic and prophylactic drugs.

В данном исследовании были использованы два кандидатных холерных фага E1 1 и C1, входящих в число экспериментальных диагностических фагов *V. cholerae* O1 серогруппы бивара *El Tor* и *Classical*. Данные бактериофаги выделены из водных объектов окружающей среды. Изучение биологических свойств, электронно-микроскопическое исследование и выделение ДНК проводили общепринятыми методами. Геномная последовательность бактериофагов была определена на платформе Mizeq. Сравнение собранных геномов бактериофагов с аннотированными последовательностями известных бактериофагов проводили при помощи алгоритма BLASTN. Наличие или отсутствие нежелательных генов, характерных для умеренных бактериофагов, проверяли при помощи программного обеспечения Phage Analyzer (<http://antiplague.ru/phageanalyzer/>).

Исследованный холерный бактериофаг E1 1 активен в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы бивара *El Tor*, а вибриофаг — в отношении C1 бивара *Classical*. После проведения трансмиссионной электронной микроскопии было установлено, что фаг E1 1 принадлежит к семейству *Podoviridae*. В свою очередь, фаг C1 относится к V морфогруппе и типу A семейства *Myoviridae*. Исследованные бактериофаги имеют высокий спектр литической активности до 83,3 % на коллекции изолятов *V. cholerae*, выделенных на территории РФ с 2000 по 2019 г., и способны достигать титра на штамме-хозяине не менее 10⁹ БОЕ/мл. На газоне индикаторной культуры бактериофаг E1 1 образует прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–2,0 мм, а фаг C1 — 1,5–2 мм. Результат биоинформатического анализа показал, что бактериофаги E1 1 и C1 относятся к ДНК-содержащим головчатым фагам из группы *Vibrio phage* и являются оригинальными.

Кандидатные бактериофаги E1 1 и C1 используются для дифференциации холерного вибриона O1 серогруппы бивара *El Tor* и *Classical*. Исследованные фаги являются вирулентными и перспективными компонентами для создания лечебно-профилактических препаратов против холеры, что позволяет расширить возможности в тактике лечебных мероприятий.

**РАЗРАБОТКА ВЫСОКОИММУНОГЕННОЙ ЖИВОЙ
ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПУТЕМ
ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ NS1 БЕЛКА ***

DEVELOPMENT OF BROADLY PROTECTIVE LIVE ATTENUATED
INFLUENZA VACCINE BY TARGETED MODIFICATION OF NS1 GENE

П. И. Прокопенко, В. А. Матюшенко, Е. А. Степанова, Т. С. Котомина,
А. К. Чистякова, Е. В. Крутикова, Е. Л. Циммерман, П.-Ф. Вонг

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

P.I. Prokopenko, V.A. Matyushenko, E. A. Stepanova, T.S. Kotomina,
A. K. Chistiakova, E. V. Krutikova, E. L. Tsimmerman, Wong Pei Fong

Institut of Experimental Medicine, St. Petersburg

E-mail: pi.prokopenko@gmail.com

Аннотация

Быстрая эволюция вирусов гриппа часто приводит к несоответствию между рекомендованными ВОЗ штаммами вакцин и циркулирующими вирусами, что может резко снизить эффективность вакцины. Стратегии усиления перекрестной защиты противогриппозных вакцин имеют высокий приоритет в области общественного здравоохранения. Иммуногенные свойства живой аттенуированной гриппозной вакцины (LAIV) могут быть улучшены путем усечения белка NS1 — модулятора противовирусного врожденного иммунитета. Для усиления перекрестной защиты вакцины усеченная часть NS1 может быть заменена иммуногенными Т-клеточными эпитопами, консервативными для вирусов гриппа А и В.

Abstract

Rapid evolution of influenza viruses often results in mismatches between the WHO-recommended vaccine strains and circulating viruses, which can dramatically reduce the vaccine efficacy. Therefore, the strategies of enhancing cross-protection of influenza vaccines have a high public health priority. Immunogenic properties of live attenuated influenza vaccine (LAIV) can be improved by truncating NS1 protein, a known modulator of an-

© П. И. Прокопенко, В. А. Матюшенко, Е. А. Степанова, Т. С. Котомина, А. К. Чистякова, Е. В. Крутикова, Е. Л. Циммерман, Вонг П.-Ф., 2020

* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МД-327.2020.7.

tiviral innate immunity. The truncated part of NS1 can be replaced with immunogenic T-cell epitopes conserved across influenza A and B viruses to enhance cross-reactivity of the vaccine.

Reverse genetics methods were used to rescue LAIV viruses of H1N1 and H7N9 subtypes carrying either full-length NS1, or truncated NS1₁₂₆ genes on a Leningrad/17 backbone. In addition, a modified NS1₁₂₆-PB1 virus was rescued which encoded several CD8 T-cell epitopes of PB1 protein conserved across influenza A and B viruses [Nat Immunol. 2019; 20(5):613–625]. The expression of NS1 protein in cells was determined by Western Blot analysis using NS1-specific monoclonal antibody. C57BL/6J mice were intranasally immunized twice at a dose of 6.0 IgEID50, 21 days apart. Vaccine virus titers in lungs and nasal turbinates were assessed on day 3 after the first inoculation. Epitope-specific T-cell responses were measured in lungs and spleens on day 7 after the second dose by flow cytometry (IFN γ ICS). Humoral immunity was assessed on day 21 after the second dose by ELISA to the whole virus antigen. Protection against heterologous influenza virus challenge was monitored by viral load in the lungs, weight loss and survival rates.

The rescued recombinant LAIV viruses with truncated NS1₁₂₆ and a modified NS1₁₂₆-PB1 genes replicated in eggs and Vero cells at the same level as corresponding LAIV viruses, whereas their replication in MDCK cell was impaired. In contrast to the LAIV control viruses, the NS1-modified viruses didn't replicate in the mouse respiratory tract. Nevertheless, they induced high levels of virus-specific serum IgG antibody; in some cases, the IgG titers in the NS1-modified groups exceeded the titers in the related LAIV group. The NS1-modified LAIVs also induced high levels of virus-specific CD4 and CD8 T cells, including the population of lung tissue-resident memory T cells expressing CD69 and CD103 surface markers. The vaccines afforded significant protection of mice against virulent heterologous influenza viruses, emphasizing their cross-protective potential.

We generated a panel of NS1-modified LAIV candidates with a potential for better immunogenicity and cross-protectivity. These viruses had improved safety profile, as no active virus replication is detected in the respiratory tract. The immunity to the inserted PB1 epitopes will be further studied in relevant *in vitro* models with PBMCs from HLA-typed donors.

АДАПТИРОВАННЫЙ ВАРИАНТ ВИРУСА ГРИППА В ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ *IN VITRO* И *IN VIVO* *

ADAPTED INFLUENZA B VIRUS FOR *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES

Е. А. Прокопьева ^{1,2}, О. Г. Курская ¹, М. В. Соломатина ¹, И. А. Соболев ¹

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

E. A. Prokopyeva, O. G. Kurskaya, M. V. Solomatina, I. A. Sobolev

¹*Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

Email: e.prokopyeva@g.nsu.ru

Аннотация

Полученный антигенно актуальный вирус гриппа В штамм В/Novosibirsk/40/2017-МА моделирует у экспериментальных животных нелетальную гриппозную инфекцию с выраженными клиническими признаками заболевания. Данный штамм может быть использован для оценки эффективности противогриппозных препаратов, а также в качестве дополнительного инструмента прогнозирования эффективности вакцины против дрейфующих штаммов.

Abstract

Obtained antigenically relevant influenza virus in strain В/Novosibirsk/40/2017-МА simulates non-lethal influenza infection in experimental animals with pronounced clinical signs of the disease. This strain can be used to evaluate the effectiveness of anti-influenza drugs, as well as as an additional tool for predicting the effectiveness of a vaccine against drifting strains.

Вирус гриппа В обладает эпидемиологической значимостью из-за ежегодных сезонных подъемов заболеваемости. Получен адаптированный вариант вируса гриппа В штамм В/Novosibirsk/40/2017-МА, моделирующий

© Е. А. Прокопьева, О. Г. Курская, М. В. Соломатина, И. А. Соболев, 2020

* Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук и докторов наук № МК-3318.2019.4.

у экспериментальных животных нелетальную гриппозную инфекцию с выраженными клиническими признаками заболевания. Описаны деструктивные изменения в легких и головном мозге, нарастающие в ходе инфекции. Вирусологический анализ внутренних органов (легкие, головной мозг, печень, сердце, почки, селезенка) выявил репликацию вируса гриппа только в легких. На данной модели гриппозной инфекции проведена оценка эффективности противовирусных лекарственных средств (осельтамивира этоксисукцинат и Тамифлю®) *in vivo* и *in vitro*. Доказана высокая эффективность инновационного лекарственного средства «осельтамивира этоксисукцинат». Полученный антигенно актуальный вирус гриппа В штамм В/Novosibirsk/40/2017-МА может быть использован для оценки эффективности противогриппозных препаратов, а также в качестве дополнительного инструмента прогнозирования эффективности вакцины против дрейфующих штаммов.

РАСТЕНИЯ РОДА МЕНТА,
ОБЛАДАЮЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

PLANTS OF THE GENUS MENTHA WITH ANTI-VIRAL ACTIVITY

М. А. Проценко¹, Е. И. Филиппова¹,
Н. А. Мазуркова¹, И. Е. Лобанова², Г. И. Высочина²

¹ Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

² Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

M. A. Protsenko¹, E. I. Filippova¹, N. A. Mazurkova¹,
I. E. Lobanova², G. I. Vysochina²

¹ State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

² Central Siberian Botanic Garden, Novosibirsk

E-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Аннотация

Противовирусную активность в отношении вируса гриппа А проявили экстракты, полученные из травы *Mentha piperita*, *Mentha arvensis* и *Mentha crispa*. Наивысшую активность в отношении вируса гриппа субтипа H3N2 показали водные экстракты *Mentha arvensis* и *Mentha crispa*, а в отношении вируса субтипа H5N1 — этанольный экстракт *Mentha piperita*.

Abstract

Extracts obtained from the herb *Mentha piperita*, *Mentha arvensis* and *Mentha crispa* shown antiviral activity against influenza A virus. Aqueous extracts of *Mentha arvensis* and *Mentha crispa* revealed the highest activity against the H3N2 subtype influenza virus, and ethanol extract of *Mentha piperita* revealed the highest activity against the H5N1 subtype virus.

Растения рода мята *Mentha*, особенно мята перечная *Mentha piperita* L., являются важнейшим лекарственным и эфиромасличным растительным сырьем. *Mentha piperita* обладает противовоспалительными, антисептиче-

скими, анальгетическими свойствами. [2]. Кроме этого, экстракты *Mentha piperita* обладают противовирусной активностью против вирусов простого герпеса, болезни Ньюкасла, коревой оспы, леса Семлики и Западного Нила [3].

В качестве объектов исследования использовали траву *Mentha piperita* и *Mentha arvensis*, собранные в окрестностях Академгородка на дачном участке города Новосибирска в 2018 году и траву *Mentha crispa*, собранную в коллекционном участке лекарственных растений ЦСБС СО РАН города Новосибирска в 2018 году.

Из растений получали сухие водные и этанольные экстракты [1], которые исследовали на токсичность и противовирусную активность в отношении вируса гриппа субтипов A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1). Вируснейтрализующие свойства образцов оценивали по изменению инфекционности вируса гриппа (титра) в монослое клеток MDCK в профилактической схеме внесения экстрактов и вирусов.

Индексы нейтрализации вируса гриппа субтипа H3N2 под действием этанольных экстрактов *Mentha piperita*, *Mentha arvensis* и *Mentha crispa* находились в пределах от 2,75 до 3,25 lg, а под действием водных экстрактов — от 2,75 до 3,75 lg. В то время как индексы нейтрализации субтипа H5N1 под действием этанольных экстрактов этих растений находились в пределах от 1,75 до 2,75 lg, а под действием водных экстрактов — от 0,75 до 2,25 lg. Следует отметить, что водный экстракт *Mentha arvensis* и этанольные экстракты *Mentha piperita* и *Mentha crispa* проявляют достоверную активность в отношении обоих штаммов вируса гриппа.

Проявление вируснейтрализующей активности исследуемых экстракционных препаратов представляет потенциал растений рода *Mentha* для разработки и создания новых лекарственных противовирусных препаратов.

Литература

1. Проценко М. А., Трошкова Г. П., Косогова Т. А., Теплякова Т. В. Биологически активные соединения плодовых тел и культивируемого мицелия базидиального гриба *Aedaleopsis Tricolor* // Фундаментальные исследования. 2014. № 12, ч. 1. С. 136–140.
2. Шамшева О. В. Применение средств растительного происхождения при ОРВИ у детей // Детские инфекции. 2018. Т. 17. № 4. С. 43–45.
3. Herrmann E. C., Kucera L. S. Antiviral Substances in Plants of the Mint Family (Labiatae). III. Peppermint (*Mentha piperita*) and other Mint Plants // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1967. V. 124 (3). P. 874–878.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОИДНЫХ И МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

CHARACTERISTICS OF LYMPHOID AND MYELOID CELLS OF THE IMMUNE SYSTEM IN PATIENTS WITH COVID-19

Е. Г. Рында¹, А. Е. Гончаров¹, Н. Г. Антоневиц¹,
О. В. Тимохина¹, Я. С. Минич¹, Е. А. Головач¹,
Д. В. Бобрукевич¹, М. Л. Доценко², Э. А. Доценко²

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск*

²*Белорусский государственный медицинский университет, Минск*

A. G. Rynda¹, A. Y. Hancharou¹, N. G. Antonevich¹,
O. V. Timohina¹, Y. S. Minich¹, A. A. Halavach¹,
D. V. Babrukevich¹, M. L. Dotsenko², E. A. Dotsenko²

*¹The Institute of Biophysics and Cell Engineering
of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*

²Belarusian State Medical University, Minsk

E-mail: alenarynda@gmail.com

Аннотация

COVID-19 представляет собой заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV-2, которое часто сопровождается возникновением пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома. Клиническая картина COVID-19 варьируется от легких форм до тяжелых, и прогнозирование течения заболевания до сих пор остается неясным. Патогенез COVID-19 тесно связан с ответом организма на вирус. Нарушение регуляции иммунитета наблюдается у пациентов с тяжелой пневмонией, связанной с COVID-19. Таким образом, раннее выявление предикторов неблагоприятных исходов и своевременное и адекватное лечение пациентов с тяжелой формой COVID-19 является решающим для уменьшения смертности.

Abstract

COVID-19 is a disease caused by the SARS-CoV-2 virus that is often associated with pneumonia and acute respiratory distress syndrome. The clinical manifestation of COVID-19 varies from mild to severe, and the prognosis of the course of the disease is

still unclear. The pathogenesis of COVID-19 is closely related to the host immune response to the virus. Impaired regulation of immunity has been observed in patients with severe pneumonia associated with COVID-19. Thus early identification of predictors of adverse outcomes and timely and adequate treatment of patients with severe COVID-19 is critical to reduce mortality.

Введение

Появление нового коронавируса SARS-CoV-2 в 2019 году и приобретенные им масштабы пандемии стало одним из сильнейших вызовов человечеству за последние десятилетия. Инфекция SARS-CoV-2 характеризуется широким спектром клинических проявлений, синдромы которых начинаются от легких гриппоподобных симптомов и доходят до тяжелых пневмоний, когда пациенту необходимо экстренное вмешательство и респираторная поддержка.

T-клетки имеют решающее значение для устранения респираторных вирусных инфекций и обеспечения долговременной иммунной памяти. Несмотря на то что изучение нового вируса и реакций организма на него ведется очень активно, до сих пор мало что известно об особенностях защитных реакций T-клеток хозяина против SARS-CoV-2, хотя сообщалось, что тяжесть инфекции COVID-19 коррелирует с истощением CD4⁺ и CD8⁺ популяций T-клеток, а также повышением уровня маркеров истощения T-клеток *. Таким образом, важным шагом к выявлению первопричин такой иммунной дисфункции является выявлении тех популяций T-клеток, которые специфически активируются при воздействии антигенов SARS-CoV-2.

Цель исследования — провести анализ клеток иммунитета у пациентов с коронавирусной пневмонией, включающий определение количества клеток, стадий их дифференцировки, активации и истощения лейкоцитов, и, как итог, определение иммунных маркеров прогнозирования клинического исхода заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены 57 пациентов с пневмонией, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, подтвержденной с помощью ПЦР-теста и КТ грудной клетки. Пациенты были разделены на 2 группы: тяжелые / критические (S/C) пациенты ($n = 18$), которые лечились в отделении интенсивной терапии и нуждались в ИВЛ; пациенты средней тяжести (M) ($n = 39$). Среди пациентов группы S/C 10 умерло (D) и 8 вылечилось (Sv). Также были ис-

* Chour W. et al. Shared Antigen-specific CD8+ T cell Responses Against the SARS-COV-2 Spike Protein in HLA A* 02: 01 COVID-19 Participants // medRxiv. 2020.

пользованы образцы периферической крови от 19 здоровых доноров (HD). С использованием проточного цитометра Attune NxT идентифицировали миелоидные (миелоидные супрессорные клетки, моноциты, дендритные клетки (DC)) и лимфоидные клетки (Т, В, ILC, ЕК, ЕКТ-клетки и их субпопуляции), а также маркеры активации нейтрофилов и моноцитов (CD35, CD32, CD88, CD282). Для анализа полученных данных использовали методы непараметрической статистики, кластерный и ROC-анализ.

Результаты и их обсуждение

Значительное снижение абсолютного количества Т-клеток, В-клеток, ЕК- и ЕКТ-клеток и процентного содержания ILC-клеток было показано как в группе S/C, так и в группе М, по сравнению с HD ($p < 0,01$). Увеличение процентного содержания В-клеток было отмечено у S / С пациентов.

При сравнении группы S/C с М отмечалось снижение содержания наивных Т-клеток, в то время как содержание субпопуляций TCM, TEM, TEMRA, Т-регуляторных и активированных HLA-DR⁺ Т-клеток существенно не изменилось. Отмечали увеличение количества истощенных PD-1⁺ Т-клеток.

При анализе гранулоцитарных и моноцитарных миелоидных супрессорных клеток (G/M-MDSC) мы обнаружили повышенное относительное и абсолютное содержание CD15⁺ G-MDSC и M-MDSC (HD — 0,37 (0,25–2,37) %, М — 3,99 (2,44–7,89) %, S/C — 13,10 (4,17–20,19) %, $p = < 0,000001$) как в группе S/C, так и в М, по сравнению с HD, с более высокой частотой у пациентов S/C ($p < 0,0001$). Также наблюдалось перераспределение субпопуляций моноцитов в сторону промежуточных форм (HD — 5,4 (3,0–15,7) %, М — 16,2 (12,2–20,8) %, S / С — 25,8 (22,6–30,9) %, $p = 0,0001$). Кроме того, в обеих группах наблюдалось уменьшение субпопуляций миелоидных (mDC) (HD — 0,233 (0,165–0,270) %, М — 0,135 (0,100–0,190) %, S/C — 0,020 (0,003–0,070) %, $p = < 0,000001$) и плазмацитоидных дендритных клеток (pDC). Однако у пациентов в группе S/C оно было более значимо ($p < 0,01$).

Анализ более 100 параметров клеточного иммунитета пациентов с COVID-19 позволил выявить значительные изменения как лимфоидного, так и миелоидного звена иммунной системы. Мы определили 3 параметра, связанных с неблагоприятным исходом: снижение частоты mDC и увеличение количества M-MDSC и В-клеток. Кластерный анализ с использованием этих выбранных параметров точно разделил пациентов, находящихся в отделении интенсивной терапии, на 2 группы: D и Sv. ROC-анализ позволил рассчитать чувствительность и специфичность каждого параметра и точек

сочленения (mDC — 95,9 / 100 / <0,02 %; M — MDSC — 85,7 / 86,2 / > 12,6 %; В-клетки — 91,8 / 86,2 / > 19,1 %).

Выводы

Лимфопения Т- и ЕК-клеток наблюдалась у всех пациентов с COVID-19, однако она была более выражена у группы S/C. Значимых изменений в дифференцировке и активации Т-клеток не было обнаружено в обеих группах, сопровождаемых увеличением количества истощенных Т-клеток. Это указывает на анергию иммунной системы и может объяснить тяжелое течение болезни и случаи повторного заражения. Течение заболевания характеризуется уменьшением количества mDC и pDC, увеличением M-DSC и перераспределением моноцитов в сторону промежуточной субпопуляции. Чрезвычайно низкое содержание mDC в периферической крови, повышение содержания M-MDSC в 4–5 раз и повышенное относительное содержание В-клеток по сравнению с группой здоровых доноров были определены как предикторы неблагоприятного исхода для пациентов с пневмонией, связанной с COVID-19.

**ОПТИМИЗАЦИЯ ВАКЦИННОЙ КОНСТРУКЦИИ
ПРОТИВ ЛИХОРАДКИ МАРБУРГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КАССЕТЫ ГЕНОВ GP-VP40-NP**

**OPTIMIZATION OF THE VACCINE CONSTRUCT AGAINST
MARBURG FEVER USING THE GP-VP40-NP GENE CASSETTE**

А. В. Семенова, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева,
О. В. Пьянков, Г. В. Кочнева

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

A. V. Semenova, G. F. Sivolobova, A. A. Grazhdantseva,
O. V. Pyankov, G. V. Kochneva

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: tkacheva_av@mail.ru

Аннотация

На основе аттенуированного рекомбинантного штамма вируса осповакцины MVA получена вакцинная конструкция, несущая встройку трех генов структурных белков вируса Марбург GP-VP40-NP. Введение гена NP проведено с целью повышения протективности вакцинного конструкта при однократном режиме иммунизации.

Abstract

On the basis of an attenuated recombinant strain of vaccinia virus MVA, a vaccine construct was obtained that carries an insertion of three genes of the structural proteins of the Marburg virus GP-VP40-NP. The NP gene was introduced in order to increase the protection of the vaccine construct in a single immunization regimen.

На основе высокоаттенуированного штамма MVA вируса осповакцины ранее нами был сконструирован рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV, экспрессирующий кассету генов GP и VP-40 вируса Марбург (MARV) с образованием иммуногенных вирусоподобных частиц (ВПЧ). Штамм обеспечивает 100%-ю защиту морских свинок от летальной инфекции MARV (50 ЛД₅₀)

при двукратной вакцинации в дозе 10^8 БОЕ/животное внутримышечно с интервалом 4 недели. Однако только 40%-я защита регистрируется при однократной иммунизации, которая является предпочтительной при ликвидации вспышек такой быстротекущей инфекции, как лихорадка Марбург. Усилить протективные свойства вакцинной конструкции можно путем введения дополнительного гена нуклеопротеина (NP) MARV в экспрессируемую кассету.

Основную роль в формировании ВПЧ играет матриксный белок VP40 MARV, который обладает способностью к самосборке и почкованию на мембране клетки. Включение в ВПЧ поверхностного гликопротеина GP MARV является необходимым условием, поскольку он несет основные протективно значимые детерминанты вируса. Нуклеопротеин NP выполняет роль внутреннего каркаса (кора) и стимулирует сборку ВПЧ. Кроме того, NP содержит дополнительные протективные Т-клеточные эпитопы [1].

Для введения трансгена NP MARV в геном вакцинного штамма MVA-GP-VP40-MARV нами была сконструирована инсерционная плаزمиды rIGR-mH5-NPmar-Pat, содержащая встройку гена NP под контролем высокоэффективного раннего синтетического промотора mH5 вируса осповакцины. Ген NP MARV получали методом ПЦР на матрице кДНК геномной РНК вируса с последующей оптимизацией его структуры методом направленного мутагенеза с целью удаления возможных сайтов терминации транскрипции ранних генов штамма MVA (GGGG, CCCC, TTTTNT). Инсерционная плаزمиды обеспечивает встройку оперона mH5-NP-MARV в межгенный промежуток генома MVA (18R — G1L) за счет гомологичной рекомбинации между плазмидной и вирусной ДНК в инфицированных вирусом MVA клетках. Рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-NP-MARV получали методом временной доминантной селекции с использованием в качестве доминантного селективного маркера гена устойчивости к пуромицину Pat.

Введение дополнительного гена NP MARV в вакцинный конструктор позволит, как мы рассчитываем, увеличить уровень продукции ВПЧ и обеспечит повышение протективности при однократной иммунизации против лихорадки Марбург. Возможность 100%-й защиты при однократной иммунизации конструкторами на основе MVA была показана для другой филовиральной инфекции — лихорадки Эбола [2].

Литература

1. Dye J. et al. Virus-like particle vaccination protects nonhuman primates from lethal aerosol exposure with Marburg virus // *Viruses*. 2016, Vol. 8. P. 94. doi 10.3390/v8040094
2. Domi A. et al. Single dose of modified vaccinia Ankara expressing Ebola virus like particles protects nonhuman primates from lethal Ebola virus challenge // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. P. 864. doi:10.1038/s41598-017-19041-y.

**ВИРУСЫ ГРИППА С ЛЮЦИФЕРАЗНЫМ РЕПОРТЕРОМ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ
НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ***

**INFLUENZA VIRUSES WITH LUCIFERASE REPORTER DESIGNED
FOR VACCINE-INDUCED NEUTRALIZATION ANTIBODY ASSESSMENT**

М. В. Сергеева¹, А. А. Пулкина^{1, 2}, Е. А. Романовская-Романко¹,
А. С. Мустафаева³, М. А. Стукова¹

¹ *Научно-исследовательский институт гриппа
им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*

³ *Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет)*

M. V. Sergeeva¹, A. A. Pulkina^{1,2}, E. A. Romanovskaya-Romanko¹,
A. S. Mustafaeva³, M. A. Stukova¹

¹ *Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg*

² *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*

³ *St. Petersburg State Institute of Technology*

E-mail: mari.v.sergeeva@gmail.com

Аннотация

Реакция микронейтрализации широко используется в мировой практике для выявления и определения образующихся в результате вакцинации вируснейтрализующих антител в сыворотках крови. Тест основан на ингибировании репродукции вируса в чувствительных клетках, которую фиксируют по цитопатическому действию или специфическим окрашиванием. Использование вирусов, кодирующих люциферазный репортер, позволяет сократить сроки проведения теста и упростить процедуру детекции за счет прямого измерения биолюминесцентного сигнала.

© М. В. Сергеева, А. А. Пулкина, Е. А. Романовская-Романко, А. С. Мустафаева, М. А. Стукова, 2020

* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых № 075-15-2019-226.

Abstract

Microneutralization assay (MNA) is the widely used method for assessment of the virus-neutralizing antibodies formed as a result of vaccination in blood serum. The test is based on inhibition of viral reproduction in sensitive cells, which is fixed by cytopathic effect or specific staining. The use of viruses encoding a luciferase reporter makes it possible to shorten the test time and simplify the detection procedure due to the direct measurement of the bioluminescent signal.

The aim of the present study was to design reporter influenza viruses and method for detection of neutralizing antibodies in post-vaccination serum samples.

By the reverse genetics we constructed influenza viruses with NanoLuc reporter gene inserted in the NS1 protein ORF, that is early expressed during infection. We generated reassortant influenza A viruses using the backbone of A/PR/8/34 strain and surface antigens (HA and NA) from divergent strains (H1N1pdm09, H3N2, H1N1, H5N1, H1swN1). Generated viruses were genetically stable, developed bioluminescent activity during cell infection, but differed by their reproduction activity.

The general MNA protocol was used as the basis for luciferase neutralization assay (LNA) development — serum was pretreated with RDE, titrated 2-fold starting from 1:10 and incubated with virus for 1h prior to addition to cells. The multiplicity of infection was optimized to shorten the detection time up to 6 hpi.

Using LNA we assessed the blood serum samples obtained from volunteers before and after vaccination with seasonal influenza inactivated vaccine. (Ethic statement: Serum samples were obtained from the collection of the Smorodintsev Research Institute of Influenza, originated from the epidemiological study, were coded and impersonal). The results obtained were compared with the results of classical MNA and hemagglutination inhibition test (HI) using both reporter viruses and wild-type viruses.

The results of LNA correlated with the results of MNA, as well as with the HI results. At the same time, the use of luciferase vectors significantly reduced the time of the neutralization test due to the greater sensitivity of bioluminescent detection of viral reproduction compared to enzyme-linked immunosorbent assay used in the classical microneutralization.

ХИМЕРНЫЙ РЕАССОРТАНТ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ ГРИППА А И В ИНДУЦИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСАМ ГРИППА ОБОИХ ПОДТИПОВ*

CHIMERIC A/B INFLUENZA REASSORTANT INDUCES ANTIBODY RESPONSE TO BOTH INFLUENZA SUBTYPES

Е. А. Степанова, Е. В. Крутикова, П.-Ф. Вонг, А. К. Чистякова

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

E. A. Stepanova, E. V. Krutikova, P.-F. Wong, A. K. Chistiakova

Institute of experimental medicine, St. Petersburg

E-mail: fedorova.iem@gmail.com

Аннотация

Химерный реассортант, гемагглютинин и нейраминидаза которого унаследованы от вируса гриппа В, а остальные 6 генов — от холодоадаптированного вируса гриппа А, в эксперименте на животных вызвал индукцию иммунного ответа, направленного как против вирусов гриппа В, так и против вирусов гриппа А. По данным ИФА, IgG антитела в сыворотках иммунизированных животных связывались с вирусами гриппа А и В. Антигемагглютинирующая и вируснейтрализующая активность антител в сыворотках животных, привитых химерным вирусом, была детектирована против вируса гриппа В.

Abstract

Chimeric reassortant strain, with hemagglutinin and neuraminidase from influenza B, and 6 genes from influenza A, induced antibody response against both influenza A and B viruses in experiment. IgG serum antibodies in ELISA were detected against influenza B and influenza A antigens. Anti-hemagglutinating and neutralizing activity was detected against influenza B virus.

Введение

Разработка универсальных противогриппозных вакцин является приоритетной задачей. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) стимулирует развитие

© Е. А. Степанова, Е. В. Крутикова, П.-Ф. Вонг, А. К. Чистякова, 2020

* Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-3336.2019.4.

как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, совместное действие которых обеспечивает защитный эффект широкого спектра действия. Ранее на основе штамма ЖГВ нами был получен экспериментальный реассортант, содержащий модифицированные 4-й и 6-й сегменты генома: фрагмент, кодирующий эктодомен гемагглютинаина, и кодирующая последовательность гена нейраминидазы унаследованы от вируса В/Brisbane/60/2008, остальные сегменты генома, а также последовательности, отвечающие за упаковку 4-го и 6-го сегментов — от холодоадаптированного донора аттенуации ЖГВ А/Ленинград/134/17/57. В данной работе оценивались показатели гуморального иммунного ответа после интраназальной иммунизации животных химерным генно-инженерным реассортантом на основе вирусов гриппа А и В.

Материалы и методы

Мыши С57bl/6J были дважды интраназально иммунизированы химерным вирусом в дозе 6 lg ЭИД₅₀/мл с интервалом в 3 недели. Через 21 день после второй иммунизации изучали уровни сывороточных антител к вирусам гриппа А и В в ИФА, РТГА и реакции микронеutralизации. В качестве антигенов использовали вирус гриппа В/Brisbane/60/2008 и вакцинный штамм ЖГВ А/17/New York/2015/5364 (H1N1).

Результаты

После двукратной интраназальной иммунизации химерным реассортантом в сыворотках мышей удалось детектировать иммуноглобулины класса G, связывающиеся как с В, так и с А вирусом гриппа. Среднегеометрический титр сывороточных IgG против вируса гриппа В составил 1:2256, против вируса гриппа А — 1:282. В контрольной группе антитела были ниже детектируемого уровня (< 20). Как и ожидалось, антигемагглютинирующей активностью антитела обладали только против вируса гриппа В (титр 1:20). Вируснейтрализующая активность также была детектирована в реакции с гриппом В, нейтрализующей активности против гриппа А обнаружено не было.

Выводы

Интраназальная иммунизация химерной вакциной на основе вирусов гриппа А и В стимулировала образование сывороточных антител против вирусов обоих подтипов. Антигемагглютинирующая и нейтрализующая активность была детектирована против вируса гриппа В.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ГЕНЕТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЦИРКОВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

FEATURES OF THE STRUCTURE AND GENETICS OF PORCINE CIRCOVIRUS

Я. Б. Стрельцова

Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко, Москва

Ya. B. Streltsova

Federal Scientific Centre VIEV, Moscow

E-mail: umesino@outlook.com

Аннотация

Обзор посвящен генетическому разнообразию цирковируса свиней (ЦВС), который является возбудителем цирковирусной болезни свиней (ЦВБС). Приведены свежие данные о генетике вируса, его таксономии, а также о многообразии генотипов.

Abstract

Porcine circovirus (PCV) is a causative agent of porcine circoviral disease (PCVD). The article provides recent data on the genetics of the virus, its taxonomy, as well as on the diversity of genotypes.

Впервые вирус был описан 15 немецкими учеными в 1974 г. как контаминант перевиваемой клеточной культуры почек свиньи РК; выделенный вирус не имел патогенных свойств и был назван ЦВС-1 [4]. В 1991 году в Канаде зафиксирована первая инфекционная вспышка, связанная с ЦВБС, выделенный вирус получил название ЦВС-2 [2]. В 2015 году учеными США выделен ЦВС-3 [3]. В конце 2019 года в Китае обнаружен ЦВС-4 [6].

Согласно актуальным данным Международного комитета по таксономии вирусов, цирковирусы объединяют в род *Circovirus* семейства *Circoviridae* [1].

На данный момент цирковирусы считают самыми микроскопическими представителями царства вирусов, когда-либо обнаруженных у животных.

Диаметр вириона составляет от 13 до 25 нанометра. Капсид состоит из 60 субъединиц белка, образуя форму додекаэдра. Геном представлен кольцевой одноцепочечной ДНК. Вирусы в зависимости от типов имеют следующие нуклеотидные последовательности: ЦВС-1 — 1758–1760 нуклеотидов (нт), ЦВС-2 — 1766–1769 нт, ЦВС-3 — 1999–2001 нт, ЦВС-4 — 1770 нт [1, 3].

Цирковирусы свиней содержат три основные рамки считывания (ORF), расположенные в цепях репликативной формы (RF). Строение генома разных генотипов цирковируса представлено в таблице [1, 3].

Классификация ORF

Тип	ORF	Белки и их размер (ак)	Функция
ЦВС-1	ORF1	Rep — 312 Rep' — 168	Индукцируют репликацию
	ORF2	Cap — 230–233	
ЦВС-2	ORF1	Rep — 314 Rep' — 297	Индукцируют репликацию
	ORF2	Cap — 233–236	Определяет антигенность вируса
	ORF3	104–105	Индукцирует апоптоз
	ORF4	60	Подавляет активности каспазы и регулирует CD4 (+) и CD8 (+) Т-лимфоцитов во время инфекции ЦВС-2
ЦВС-3	ORF1	Rep — 296–297	Индукцирует репликацию
	ORF2	Cap — 214	
	ORF3	206	

На данный момент учеными проводится расшифровка генома ЦВС-4, однако уже существуют предположения о том, что его геном будет иметь репликативный и капсидный белки [6].

В результате проведенного филогенетического анализа ЦВС-3 учеными было предложено делить вирус на два подтипа: ЦВС-3а и ЦВС-3б [6].

Согласно последним исследованиям, основанным на филогенетическом анализе последовательности генома ЦВС-2 и последовательностей ORF2, ЦВС-2 принято делить на шесть генотипов: ЦВС-2а, ЦВС-2б, ЦВС-2с, ЦВС-2д, ЦВС-2е и ЦВС-2ф [5].

Литература

1. Afolabi K. O., Iweriebor B. C., Okoh A. I., Obi L. C. Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa // *Advances in Virology*. 2017. P. 1–16.
2. Ellis. J. Porcine Circovirus: A Historical Perspective // *Veterinary Pathology*. 2014. Vol. 51(2). P. 315–327.
3. Klaumann F., Correa-Fiz F., Franzo G., Sibila M., Núñez J. I., Segalés J. Current Knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A Novel Virus With a Yet Unknown Impact on the Swine Industry // *Front Vet Sci*. 2018; Vol. 5. P. 315.
4. Tischer I., Rasch R., Tochtermann G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines // *ZBL.BAKT.REIHE A*. 1974. Vol. 226(2). P. 153–167.
5. Wei R., Jiexiong Xie, Theuns S., Nauwynck H. J. Changes on the viral capsid surface during the evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) from 2009 till 2018 may lead to a better receptor binding // *Virus Evolution*. 2019. V. 5 (2). P. 1–12.
6. Zhang H. H., Hu W. Q., Yu Li J., Liu T. N., Zhou J. Y., Opriessnig T., Xiao C. T. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus Hunan province, China // *Transbound Emerg Dis*. 2019. P. 1–5.

**ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА
ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ЩЕНКОВ ЕНОВОИДНОЙ СОБАКИ
ПРОТИВ ЧУМЫ ПЛОТЯДНЫХ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ПРОБИОТИКА СУБАЛИН**

**ASSESSMENT OF POST-VACCINATION IMMUNITY
AFTER VACCINATION OF PUPPIES RACCOON DOGS AGAINST
CANINE DISTEMPER APPLICATION OF PROBIOTIC SUBALIN**

В. С. Тюфяков¹, А. С. Сюткина^{2,3}, И. И. Окулова^{1,3}

¹ *Кировский государственный медицинский университет*

² *Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Киров*

³ *Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б. М. Житкова, Киров*

V. S. Tyufyakov¹, A. S. Syutkina^{2,3}, I. I. Okulova^{1,3}

¹ *Kirov State Medical University*

² *Vyatka State Agricultural Academy, Kirov*

³ *B. M. Zhitkov Russian Scientific Research Institute
on Game Management and Fur Farming (VNIIOZ), Kirov*

E-mail: tufyakov24012002@gmail.com

Аннотация

В работе при вакцинации щенков енотовидной собаки против чумы плотоядных был использован пробиотик Субалин в дозе 10–20·10⁷ КОЕ/кг; были проведены исследования на содержание γ -глобулинов, титр-антител и опсоно-фагоцитарной реакции. Установлено, что пробиотик опосредованно стимулирует иммунитет по сравнению с контрольной группой.

Abstract

In the course of vaccination of raccoon dog pups against plague — carnivores, the probiotic Subalin was used at a dose of 10–20·10⁷ COE/kg, studies were conducted on the content of γ -globulins, antibody titer and opsonophagocytic reaction, and it was found that the probiotic indirectly stimulates the immune system by increasing the studies performed compared to the control group.

Чума домашних и диких плотоядных животных — одна из самых распространенных и широко известных инфекционных болезней. Она наносит значительный экономический ущерб пушному звероводству и собаководству по причине высокой летальности. В настоящее время при массовой вакцинопрофилактике против чумы плотоядных отход от этой болезни в звероводстве можно считать спорадическим. Для специфической профилактики в звероводческих хозяйствах применяют вакцины на основе живых штаммов «БИОНОР-D». Целью исследования было изучение влияния Субалина на формирование иммунного ответа при вакцинации енотовидной собаки против чумы плотоядных. Исследования проводили на пушных зверях семейства *Canidae* в ООО «Звероводческое племенное хозяйство “Вятка”» Кировской области. Молодняку енотовидной собаки (в возрасте 60 дней) в корм добавляли препарат пробиотического действия Субалин в течение 5 дней (за 3 дня до вакцинации и 2 дня после) в дозе $10-20 \cdot 10^7$ КОЕ/кг. К зверям контрольной группы Субалин не применяли. Определение иммунологических показателей проводили с использованием общепринятых методик: фагоцитарная активность нейтрофилов по методу А. С. Лабинской (1978), определение фракций белка (альбуминов, α -, β -, γ -глобулинов) нефелометрическим методом, бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) по методу Т.А. Кузьминой и О.В. Смирновой (1966), титр вирусспецифических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Забор проб крови производили до вакцинации и на 7, 14, 21 и 28-й день после проведенной иммунизации. В результате исследований установлено, что в опытной группе на 14-й день содержание γ -глобулинов увеличилось в 1,5 раза, что составило $23,8 \pm 1,043$ % ($P < 0001$) по сравнению с контролем $15,0 \pm 0,43$ %. При определении титра вирусспецифических антител установлено, что к 14-му дню в опытной группе титры-антител увеличились на 39,3 % ($P < 0001$) (рис. 1), фагоцитарная активность нейтрофилов — на 33,4 % ($P < 0001$) (рис. 2) и бактерицидная активность сыворотки крови — на 43,7 % ($P < 0001$) (рис. 3) по сравнению с контролем. К 21 и 28-му дню исследования происходит снижение показателей как в опытной, так и в контрольной группах зверей.

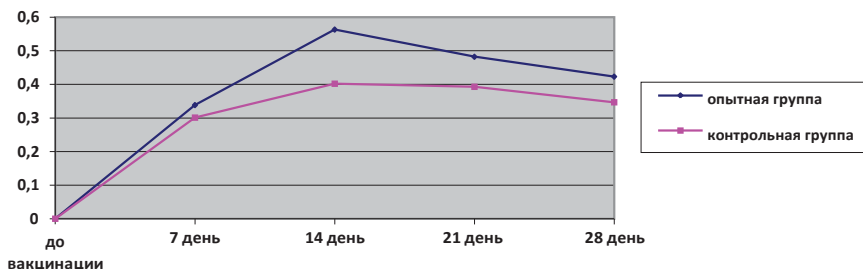


Рис. 1. Динамика титров вирусспецифических антител (оптическая плотность)

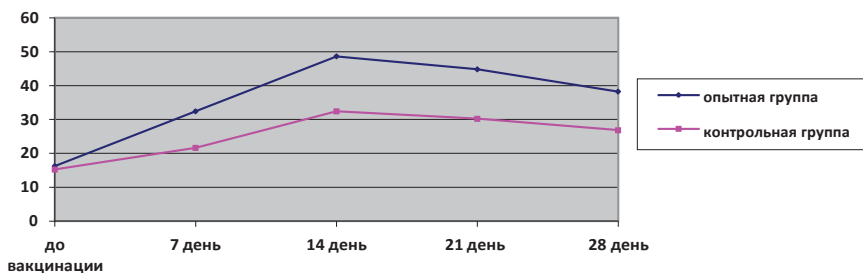


Рис. 2. Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов

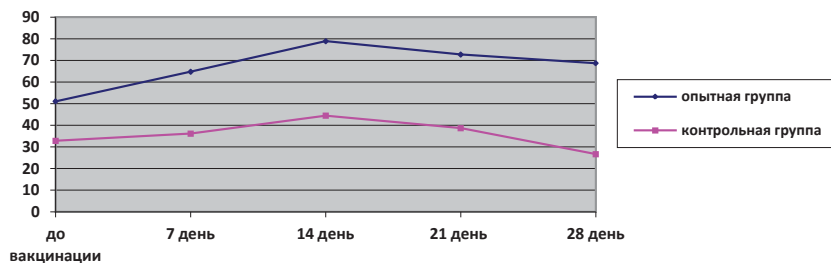


Рис. 3. Динамика бактерицидной активности сыворотки крови (%)

Вывод

Установлено, что применение Субалина в дозе $10-20 \cdot 10^7$ КОЕ/кг при вакцинации щенков против чумы плотоядных опосредованно стимулирует формирование поствакцинального иммунитета увеличением содержания γ -глобулинов, опсонофагоцитарной реакции и вирусспецифических антител.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ
ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
СЕМИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ АЛЬФАВИРУСОВ

SEQUENCING AND ANALYSIS OF COMPLETE GENOMES
FOR SEVEN DIFFERENT SPECIES OF ALPHAVIRUSES

Ю. А. Хорошавин

Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

Y. A. Khoroshavin

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: horoshavin_yua@vector.nsc.ru

Аннотация

В исследовании были использованы образцы семи различных видов альфавирусов. В ходе работы определены их полногеномные последовательности и проведен их сравнительный анализ с уже известными геномными последовательностями различных представителей рода *Alphavirus*.

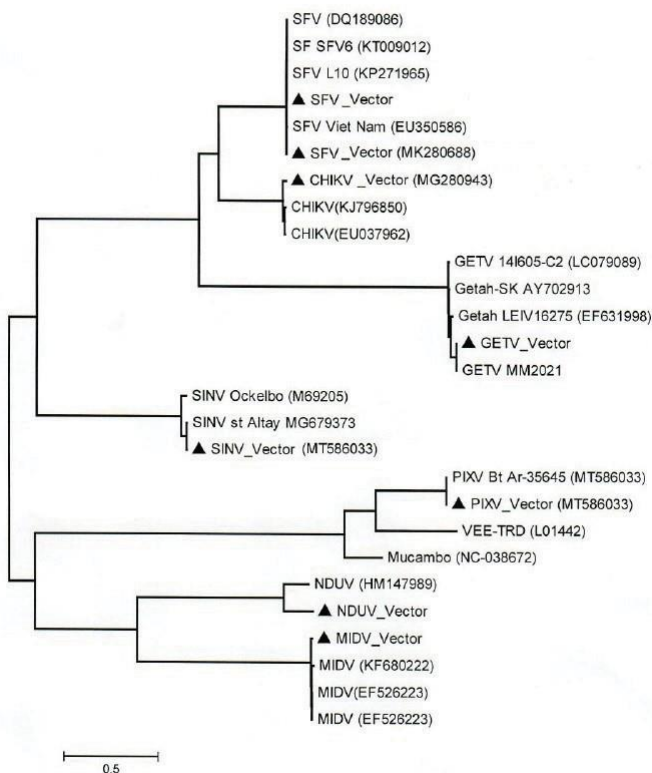
Abstract

We used samples of seven different species of alphaviruses. In this study, the full-genomic sequences are obtained and their comparative analysis was carried out with already known genomic sequences of different members of the genus *Alphavirus*.

В последние годы наблюдается всё более широкое распространение вирусов, передающиеся трансмиссивным путем через членистоногих переносчиков. Это объясняется как увеличением транспортной мобильности человека, в том числе и межконтинентальной, так и расширением ареала членистоногих переносчиков, связанным с климатическими изменениями. Наиболее распространенным вектором вирусных заболеваний являются комары. Вирусы рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*, вызывают как легкие или даже бессимптомные заболевания человека и животных, так и тяжелые заболевания с вероятностью летального исхода или тяжелой инвалидиза-

ции. Эти вирусы широко распространены на всех континентах, в том числе и России, и передаются различными видами комаров. Расширение ареала комаров в Евразии увеличивает вероятность появления новых видов альфа-вирусов на территории России.

Геном альфа-вирусов имеет две открытые рамки считывания, одна из которых кодирует неструктурные белки, а вторая структурные. Эта особенность позволяет встраивать последовательности структурных белков других вирусов. Учитывая мощный экспрессионный потенциал альфа-вирусов и возможность инфицирования клеток путем трансфекции геномной РНК, это делает их перспективным вектором для продукции рекомбинантных белков в клетках и возможной платформой для создания новых вакцин.



Филогенетическое дерево исследуемых альфа-вирусов в сравнении с прототипами

Цель исследования — определение полногеномных последовательностей различных видов альфавирусов, установление уровня гомологии с ближайшими прототипами и представителями известных антигенных комплексов альфавирусов.

В исследовании мы использовали семь видов альфавирусов: вирус Леса Семлики, Чикунгунья, Гета, Синдбис, Пиксуна, Ндуму и Миддельбург. Посредством методов NGS и секвенирования по Сэнгеру были определены их полногеномные нуклеотидные последовательности. Далее был проведен поиск гомологичных последовательностей в базе данных Genbank и их сравнительный анализ. Ни для одного из исследуемых штаммов не было найдено последовательностей со 100 % идентичностью, что говорит об их оригинальности. Уровень гомологии при сравнении наших последовательностей и самых близких прототипов составил от 97,99 до 99,58 %. Самые близкие последовательности были выбраны в качестве прототипов для построения филогенетического дерева (см. рисунок). При сравнении с прототипами и построении филогенетического дерева исследуемые последовательности вошли в комплексы, соответствующие принятым представлениям о филогении и таксономии этих альфавирусов. Проведен анализ генетических особенностей этих видов вирусов. Обращает на себя внимание генетическая схожесть исследованных альфавирусов с вирусом Синдбис (MG679373), выделенным ранее на Алтае, и вирусом Гета, обнаруженным в Монголии (EF631999) и России (EF631998) в комарах родов *Aedes* spp. и *Culex* spp.

ВПЧ-ПОЗИТИВНЫЙ РАК ГОРТАНИ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОГНОЗОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

HPV-POSITIVE LARYNGEAL CANCER: CONNECTION WITH THE EFFECT OF THE TREATMENT AND PROGNOSIS OF THE DISEASE

И. А. Цыденова^{1,2}, М. К. Ибрагимова¹, М. М. Цыганов¹,
Д. С. Долгашева^{1,2}, О. В. Черемшина¹, Н. В. Литвяков¹

¹ *Научно-исследовательский институт онкологии
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН*
² *Томский государственный университет*

I. A. Tsydenova^{1,2}, M. K. Ibragimova¹, M. M. Tsyganov¹,
D. S. Dolgasheva^{1,2}, O. V. Cheremishina¹, N. V. Litviakov¹

¹ *Cancer Research Institute Tomsk,
Tomsk National Research Medical Center of RAS*
² *Tomsk State University*

Email: tsydenova422@gmail.com

Аннотация

В основе возникновения рака гортани (РГ) лежит длительное существование хронических воспалительных процессов, индуцированных и поддерживаемых комплексным воздействием ряда этиологических начал. Однако до сих пор нет информации о влиянии ВПЧ-позитивного статуса на выживаемость и лечение пациентов с РГ. Целью данной работы являются оценка наличия вируса папилломы человека ВПЧ в опухоли у больных РГ и оценка связи ВПЧ с эффектом лечения.

Abstract

The occurrence of laryngeal cancer (LC) is based on the long-term existence of chronic inflammatory processes induced and maintained by the complex effects of a number of etiological principles. However, there is still no information on the effect of HPV-positive status on the survival and treatment of patients with LC. Thus, the aim of this work is to assess the presence of the human papillomavirus HPV in the tumor in patients with LC and to assess the relationship of HPV with the treatment effect.

Материалы и методы

В исследование включен 101 больной плоскоклеточным раком гортани I–III стадии с морфологически верифицированным диагнозом; больные находились на лечении в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. В качестве исследуемого материала был использован операционный материал нормальной и опухолевой ткани гортани (~10–50 мм³) после операции, помещенный в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Germany). ДНК выделяли с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia) с использованием комплектов реагентов фирмы Amplisens® (Москва, Россия). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Результаты

Из результатов проведенного исследования следует, что инфицированность ВПЧ в опухолевой ткани и прилежащем неизменном эпителии составила 16,8 (17/101) и 19,8 % (20/101) соответственно (рис. 1). Всего ВПЧ был обнаружен в нормальной и/или опухолевой ткани у 25 больных.

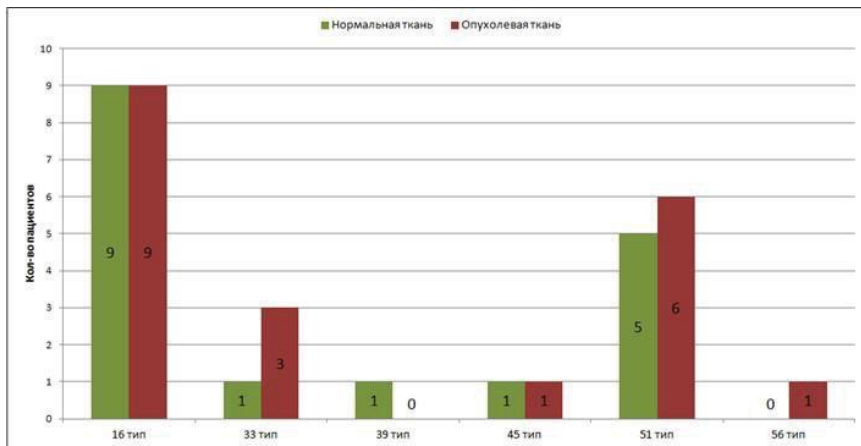


Рис. 1. Распространенность ВПЧ-инфекции при раке гортани в опухолевой ткани и в прилежащем эпителии

Важно отметить, что у 5 пациентов наличие ВПЧ наблюдалось только в опухолевой ткани гортани, у 8 пациентов только в нормальной ткани. У 12 больных вирус был обнаружен в обоих образцах. Во многих исследованиях отмечены более высокие показатели безрецидивной и общей выживаемости ВПЧ-положительных пациентов по сравнению с ВПЧ-негативными. Примечательно, что в группе ВПЧ-положительных пациентов с РГ показана 100 % безметастатическая и безрецидивная выживаемость (рис. 2).

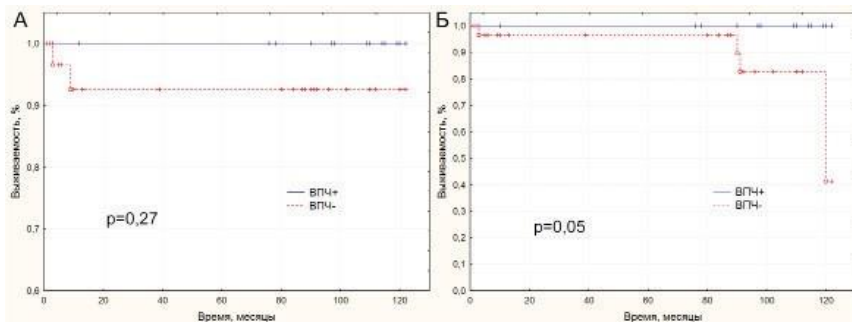


Рис. 2. Безметастатическая (А) и безрецидивная (Б) выживаемость ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных больных РГ (log-rank test, $p = 0,27$ и $0,05$ соответственно)

Статистически значимые различия показаны только для безрецидивной выживаемости (log-rank test, $p = 0,05$), рис. 2, Б. Кроме того, проведенный анализ связи наличия ВПЧ в опухолевой ткани с эффектом лучевой терапии не показал статистически значимых различий.

Заключение

Полученные результаты указывают на важность и перспективность проведения более подробного исследования в представленном направлении, поскольку до сих пор нет четкой информации о связи ВПЧ и рака гортани, и зависимости выживаемости от наличия ВПЧ у пациентов.

**ПЦР-РВ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ
ПРИ ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КРАСНУХИ В ОПЫТЕ
НА ОБЕЗЬЯНАХ МАКАКА-РЕЗУС**

PCR-RT AS AN ADDITIONAL TEST FOR EVALUATING THE SPECIFIC
SAFETY OF ATTENUATED RUBELLA VIRUS STRAINS
IN THE EXPERIMENT ON RHESUS MACAQUE MONKEYS

О. А. Шамсутдинова¹, И. Н. Лаврентьева², Д. Д. Карал-оглы¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

O. A. Shamsutdinova¹, I. N. Lavrientieva², D. D. Karal-ogly¹

¹Research Institute of Medical Primatology, Sochi

²St. Petersburg Pasteur Institute

E-mail: shamsutdinova-o-a@yandex.ru

Аннотация

Сравнительное изучение нейровирулентности вакцинных штаммов вируса краснухи показало отсутствие остаточной нейровирулентности как у отечественного вакцинного штамма «Орлов-В», так и у штамма RA 27/3, входящего в состав коммерческих культуральных живых вакцин. Показана информативность метода ПЦР-РВ при контроле диссеминации аттенуированных штаммов и возможность использования ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при оценке специфической безопасности аттенуированных штаммов живых вакцин.

Abstract

A comparative study of the neurovirulence of vaccine strains of rubella virus showed the absence of residual neurovirulence in both the domestic vaccine strain «Orlov-B» and the strain RA 27/3, which is part of commercial live culture vaccines. The informative value of the PCR-RT method in controlling the dissemination of attenuated strains and the possibility of using PCR-RT as an additional test for evaluating the specific safety of attenuated strains of live vaccines is shown.

Разработка новых медицинских иммунобиологических препаратов, в том числе и живых вакцин, включает как контроль специфической активности, так и оценку специфической безопасности аттенуированных штаммов вирусов. Необходимо отметить, что в настоящее время единственным рекомендованным методом оценки остаточной нейровирулентности аттенуированных вакцинных штаммов в тесте интрацеребрального заражения обезьян является гистологическое исследование ЦНС экспериментальных животных.

Принимая во внимание тот факт, что вакцины против кори, краснухи, эпидемического паротита и полиомиелита содержат хоть и ослабленные, но живые нейровирулентные вирусы, весьма актуальным представляется разработка дополнительных тестов, подтверждающих стабильность аттенуации и контроль экстраневральной диссеминации аттенуированных штаммов, основанных на современных методах лабораторной диагностики.

В настоящее время в лабораторной диагностике все чаще используют молекулярно-биологический метод исследования — полимеразную цепную реакцию с детекцией в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ), для которой характерна высокая специфичность, чувствительность и меньшая длительность реакции по сравнению с другими вирусологическими методами.

Цель исследования — определение возможности использования метода ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при определении степени остаточной нейровирулентности вакцинных штаммов вируса краснухи.

В исследовании были использованы два вакцинных штамма — «Орлов-В» и RA 27/3 и «дикий» штамм «Орлов», изолированный в 1979 г. В. Н. Мешаловой от ребенка, больного манифестной формой краснухи. Вирусодержащий материал вводили в объеме 0,25 мл в зрительный бугор каждого полушария головного мозга клинически здоровых обезьян вида *Macaca mulatta*, содержащихся в питомнике ФГБНУ «НИИ МП». Доза вакцинных штаммов вируса соответствовала 10 минимальным прививочным дозам человека и соответствовала $10000 \text{ TCID}_{50}/0,5 \text{ мл}$. Клиническое наблюдение за обезьянами проводили ежедневно в течение 28 суток, на протяжении которых у животных инфицированных штаммами «Орлов-В» и RA 27/3, не было отмечено проявлений общих клинических и неврологических симптомов, типичных для данного заболевания. Согласно результатам гистологического исследования различных отделов ЦНС обезьян, инокулированных вакцинными штаммами, средний балл поражений ЦНС составил 0,0–0,1. Для выявления РНК вируса краснухи из 10 % суспензии образцов

тканей ЦНС, паренхиматозных органов, а также спинномозговой жидкости и плазмы периферической крови, использовали набор реагентов «АмплиСенс Rubella virus-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Полученные результаты ПЦР-РВ свидетельствуют об отсутствии инфекционного вируса в ЦНС и периферических органах обезьян, зараженных вакцинными штаммами, что может свидетельствовать в пользу высокого уровня аттенуации вакцинных штаммов и отсутствии экстраневральной диссеминации аттенуированных штаммов.

УВЕЛИЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ***INCREASE OF IMMUNOGENICITY OF THE VACCINIA VIRUS**

С. Н. Якубицкий, Т. В. Бауэр, А. А. Сергеев,
А. С. Кабанов, С. А. Пьянков, С. Н. Щелкунов

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор», р. п. Кольцово*

S. N. Yakubitskiy, T. V. Bauer, A. A. Sergeev,
A. S. Kabanov, S. A. Pyankov, S. N. Shchelkunov

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: yakubitskiy@vector.nsc.ru

Аннотация

Изучен вопрос о том, как увеличение продукции внеклеточных вирионов, покрытых оболочкой (EEV), может влиять на вирулентные и иммуногенные свойства вируса осповакцины (VACV) в зависимости от способа его введения в организм лабораторных мышей. Исследования проводили на принятом в России для противоспенной вакцинации штамме LIVP VACV. В состав гена A34R VACV направленно ввели две точечные мутации, приводящие к достоверно большему формированию EEV по сравнению с родительским штаммом LIVP. Созданный мутантный штамм LIVP-A34R проявлял меньшую нейровирулентность и при внутрикожном введении индуцировал повышенную продукцию противовирусных антител. Такой вариант VACV может стать перспективной основой для получения аттенуированной и высокоиммуногенной вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека, а также использоваться в качестве вектора для конструирования живых рекомбинантных поливалентных вакцин против разных инфекционных заболеваний.

Abstract

In this work, we studied how an elevated production of extracellular enveloped virions (EEVs) and the route of mouse infection can influence the virulence and immunogenicity of vaccinia virus (VACV). The research subject was the LIVP strain, which is used in Russia

© С. Н. Якубицкий, Т. В. Бауэр, А. А. Сергеев, А. С. Кабанов, С. А. Пьянков, С. Н. Щелкунов, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006).

for smallpox vaccination. Two point mutations causing an elevated production of EEVs compared with the parental L1VP strain were inserted into the sequence of the VACV A34R gene. The created mutant L1VP-A34R strain showed lower neurovirulence in an intracerebral injection test and elevated antibody production in the intradermal injection method. This VACV variant can be a promising platform for developing an attenuated, highly immunogenic vaccine against smallpox and other orthopoxvirus infections. It can also be used as a vector for designing live-attenuated recombinant polyvalent vaccines against various infectious diseases.

В данной работе впервые изучен вопрос о том, как увеличение продукции EEV VACV может влиять на вирулентные и иммуногенные свойства вируса в зависимости от способа его введения в организм лабораторных мышей. Исследования проводили на принятом в России для противоспенной вакцинации штамме L1VP VACV. В состав гена A34R VACV L1VP ввели две точечные мутации, характерные для этого гена штамма IHD-J VACV. На культуре клеток CV-1 показали, что созданный мутантный вариант L1VP-A34R продуцирует достоверно большее количество внеклеточных вирусных частиц по сравнению с родительским штаммом L1VP.

Интрацеребральное заражение новорожденных мышей линии BALB/c показало, что штамм L1VP-A34R характеризуется сниженной нейровирулентностью по сравнению с родительским L1VP.

При интраназальном заражении мышей линии BALB/c оба изучаемых штамма VACV демонстрировали патогенное воздействие на организм животных, что выявлялось по клиническим признакам и снижению массы тела мышей. При этом мутантный штамм VACV L1VP-A34R проявлял по этим признакам меньшую патогенность. Внутривенное или подкожное введение вирусов не приводило к снижению массы тела мышей и появлению клинических признаков заболевания даже при максимальной использованной дозе вируса — 10^8 бляшкообразующих единиц.

Иммуноферментным анализом в сыворотках крови мышей, полученных через 28 сут. после заражения исследуемыми вирусами, тестировали уровень антител, специфически взаимодействующих с вирионными белками VACV. При внутривенной инъекции L1VP-A34R обеспечивал больший иммунный ответ по сравнению с исходным VACV L1VP.

раздел 4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ВЫЯВЛЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ТЯЖЕЛЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 GENOME
METHYLATION FOR EARLY DIAGNOSTICS OF SEVERE CERVICAL
INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND CERVICAL CANCER

Т. А. Абикеева^{1,2}, М. К. Иванов^{1,3}, В. В. Дзюбенко²

¹АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово

²Новосибирский государственный университет

³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

T. A. Abikeeva^{1,2}, M. K. Ivanov^{1,3}, V. V. Dzhubenko¹

¹AO "Vector-Best", Koltsovo

²Novosibirsk State University

³Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

E-mail: abikeeva97@gmail.com

Аннотация

Рак шейки матки — одна из наиболее распространенных причин женской онкологической смертности в мире, которую возможно снизить при своевременном выявлении предраковых стадий заболевания. Более 90 % выявленных случаев РШМ обусловлены персистенцией вируса папилломы человека высокого канцерогенного

риска, среди которых около 70 % — ВПЧ16. Для профилактики РШМ проводят регулярные скрининговые обследования женщин, основным методом которых является цитологический анализ цервикального мазка. Недостаток метода — его низкая диагностическая чувствительность (40–70 %). Вторым методом скрининга, рекомендованный ВОЗ, — выявление ДНК ВПЧ ВКР в образцах цервикальных соскобов, характеризуется более высокой чувствительностью, но низкой положительной предсказательной ценностью (ППЦ). В связи с этим в мире ведутся работы по поиску биологических маркеров патологий ШМ, которые позволили бы улучшить диагностические характеристики методов скрининга. В ряде исследований показано, что частота выявления aberrантного метилирования клеточных и вирусных маркеров коррелирует с повышением тяжести поражения цервикального эпителия и риском злокачественной трансформации.

Abstract

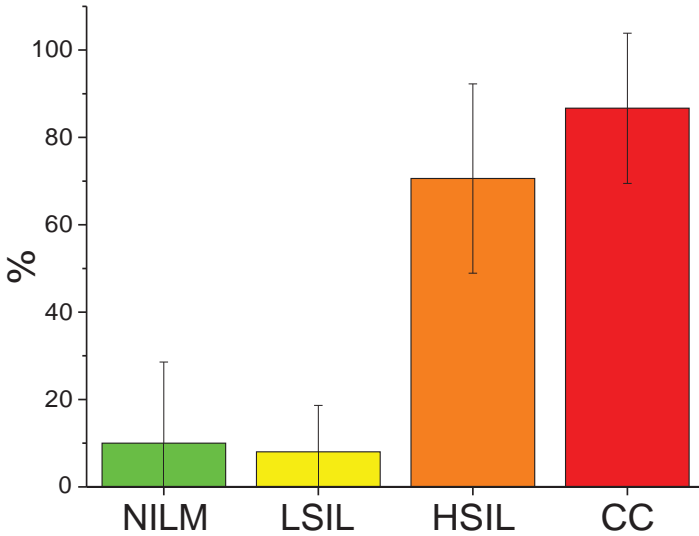
Cervical cancer is one of the most prevalent reasons for women's oncological mortality worldwide, which could be significantly reduced by timely diagnostics of precancerous states. More than 90 % of detected cervical cancer cases are caused by the persistence of high-risk human papillomavirus, where approximately 70 % are induced by HPV16. For CC prophylaxis regular screenings are carried out using cytology of cervical smears as a conventional method. The disadvantage of this method, however, is its low diagnostic sensitivity (40–70 %). Another screening method, recommended by WHO, is HR HPV DNA detection in cervical smear samples. Despite its higher sensitivity, it appears to have small positive predictive value. Thereby, the research works are being held to find biological markers of cervical pathology, which would allow to improve the diagnostic characteristics of screening methods. Several studies have reported that the frequency of aberrant methylation of cellular and viral markers correlates with the severity of cervical epithelial lesion and with the risk of malignant transformation.

Цель данной работы — разработать методику выявления aberrантного метилирования участка гена L2 ВПЧ16 на основе метил-чувствительной ПЦР и оценить ее перспективность для диагностики тяжелых дисплазий и РШМ.

С помощью разработанной нами методики выявления aberrантного метилирования участка гена L2 ВПЧ16 проанализирована выборка из 67 образцов цервикальных соскобов с различными цитологическими диагнозами: 10 NILM, 25 LSIL, 17 HSIL, 15 CC (в соответствии с системой Bethesda). В выборку включали только образцы, содержащие ДНК ВПЧ16, что определили с помощью коммерческих наборов (АО «Вектор-Бест», Россия).

На выборке показана корреляция между частотой выявления метилированных форм ДНК вируса в образцах и стадией заболевания: NILM — 10,00 %, LSIL — 8,00 %, HSIL — 70,59 %, CC — 86,67 %. Оценены диагно-

стические характеристики разработанного подхода: чувствительность составила 78,13 %, специфичность — 91,43 %, ППЦ — 89,29 %, ОПЦ — 82,05 %. Планируется апробация разработанной методики на расширенной выборке.



Частота выявления метилированных форм ДНК ВПЧ16 среди образцов с различными стадиями заболевания

**ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ
OTX2 И CRX В ПЕРИОД ПОСТНАТАЛЬНОГО СОЗРЕВАНИЯ
СЕТЧАТКИ У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS**

**EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTORS OTX2 AND CRX
IN THE RETINAL POSTNATAL DEVELOPMENT
IN A SENESCENCE-ACCELERATED OXYS RATS**

А. К. Антоненко

Новосибирский государственный университет

A. K. Antonenko

Novosibirsk State University

E-mail: antonenko-98@bk.ru

Аннотация

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — многофакторное нейродегенеративное заболевание, которое становится основной причиной необратимой потери зрения у пожилых людей. Поскольку сетчатка у взрослых практически не способна к нейрогенезу, предполагается, что заложенные в период формирования сетчатки структурно-функциональные особенности могут иметь отдаленные эффекты в онтогенезе. Показано, что изменение экспрессии регуляторных генов *Otx2* и *Crx* во время постнатального нейрогенеза сетчатки влияют на соотношение подтипов биполярных нейронов и связаны со сдвигом времени дифференцировки фоторецепторов у крыс OXYS на более поздний период.

Abstract

Age — related macular degeneration (AMD) is a multifactorial neurodegenerative disease that becomes the main cause of irreversible vision loss in older people. The adult retina is not practically capable to neurogenesis. It is suggested that the structural and functional features in the period of retinal formation may have long-term effects in ontogenesis. It is shown that changes in the expression of the regulatory genes *Otx2* and *Crx* during postnatal retinal neurogenesis affect the ratio of bipolar neuron subtypes and are associated with a shift in the time of differentiation of photoreceptors in OXYS rats to a later period.

Сетчатка млекопитающих у взрослых практически не способна к нейрогенезу и регенерации. Следовательно, заложенные в период формирования сетчатки структурно-функциональные особенности могут иметь отдаленные эффекты в онтогенезе, одним из которых является повышение предрасположенности к ассоциированным со старением заболеваниям, таким как возрастная макулярная дегенерация (ВМД). ВМД — нейродегенеративное заболевание сетчатки, которое становится основной причиной потери зрения пожилыми людьми.

Исследование направлено на выявление возможного вклада изменения экспрессии генов *Otx2* и *Crx* в сетчатке в постнатальный период в развитии

ВМД на модели этого заболевания — линии преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развивается ретинопатия, по своим проявлениям аналогичная «сухой» форме ВМД у людей. Гены *Otx2* и *Crx* — это основные регуляторы дифференцировки биполярных нейронов и фоторецепторов, а нарушение их экспрессии приводит к ряду нейродегенеративных заболеваний.

Работа проводилась на самцах крыс OXYS и Вистар (контроль) в критические для постнатального нейрогенеза дни (0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 и 20). Исследование экспрессии генов *Otx2* и *Crx* методом real-time PCR показало, что у крыс OXYS четко прослеживается задержка в паттерне генов *Otx2* и *Crx* экспрессии на ~ 3–4 дня по сравнению с крысами Вистар. Это, вероятно, приводит к смещению времени дифференцировки биполярных нейронов и фоторецепторов.

Далее мы оценили плотность *Otx2*⁺ нейронов, пан-биполярных нейронов (*Vsx2*⁺) и колбочковых биполярных нейронов (реCOVERИН⁺) на 7, 10 и 14 дни (период дифференцировки биполярных клеток). Методом ИГХ показано, что плотность *Otx2*⁺ нейронов в сетчатке крыс Вистар не изменялась с возрастом, а у крыс OXYS возрастала с 7 по 14 день. В возрасте 7 дней плотность *Otx2*⁺ нейронов у крыс OXYS была достоверно ниже, чем у крыс Вистар. При этом плотность всех типов биполярных нейронов в возрасте 7 дней у крыс OXYS ниже, а в возрасте 10 дней — выше, чем у крыс Вистар. У крыс OXYS плотности реCOVERИН⁺ биполярных нейронов резко повышалась к 10, а затем снижалась к 14 дню. На 10 и 14 дни плотность реCOVERИН⁺ биполярных нейронов у крыс OXYS выше, чем у Вистар. Полученные результаты указывают на изменение соотношения подтипов биполярных нейронов у крыс OXYS, которое в дальнейшем может приводить к функциональным изменениям в сетчатке и, соответственно, вносить вклад в последующее развитие у крыс OXYS нейродегенерации.

СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

NEXT GENERATION SEQUENCING FOR CLINICAL DIAGNOSTICS

К. Ш. Арнаудова, О. В. Астафьева, З. В. Жаркова

Астраханский государственный медицинский университет

K. Sh. Arnaudova, O. V. Astafyeva, Z. V. Zharkova

Astrakhan State Medical University

E-mail: arnaudova@mail.ru

Аннотация

Современным и перспективным методом молекулярной диагностики является полногеномное секвенирование, направленное на поиск мутаций в генах для обнаружения генетических и раковых заболеваний, выявления предрасположенности к их развитию и персонализированного подхода к терапии.

Abstract

A modern and promising method of molecular diagnostics is a next generation sequencing, which is aimed at searching for mutations in genes for detecting genetic and cancerous diseases, identifying a predisposition to their development and a personalized approach to therapy.

Today, the most promising method for diagnosing diseases is a next gene sequencing (NGS). The analysis of the obtained data using NGS in different populations revealed the individual variability of the human genome. However, there is a need to differentiate the presence of genomic variants and their relationship with the development of the disease. To address this challenge, comprehensive databases are being created to document genomic variants, including sequence variants and structural genomic variants. In addition, the NGS supplements data on the presence of correlations of genotypes with phenotypes and analysis of the biochemical and functional consequences of specific sequence variants.

Knowledge of genomic sequence variants has greatly expanded the possibilities for accurate molecular diagnostics of genetically determined diseases and facilitates personalized therapy. DNA analysis of tumors and analysis of aberrant proteins in cancer have allowed the development of targeted therapy and approaches to immunotherapy of the disease.

ТРИАЗИН-КАРБОСИЛАНОВЫЕ ДЕНДРИМЕРОСОМЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ*

TRIAZINE-CARBOSILANE DENDRIMERSOMES AS PROSPECTIVE DRUG DELIVERY PLATFORM

В. И. Архипова^{1,2}, Н. Ю. Кнауэр^{1,3}, Е. А. Пашкина^{1,3},
О. С. Боева^{1,2,3}, А. Г. Веньямина¹, Х. Санчес-Ньевес⁴,
Ф. Х. де ла Мата⁴, Р. Гомес⁴, Е. К. Апарцин^{1,2}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии, Новосибирск*

⁴ *Факультет органической и неорганической химии,
Университет Алькала, Алькала-де-Энарес, Испания*

V. I. Arkhipova^{1,2}, N. Yu. Knauer^{1,3}, E. A. Pashkina^{1,3},
O. S. Boeva^{1,2,3}, A. G. Venyaminova¹, J. Sánchez-Nieves⁴,
F. J. de la Mata⁴, R. Gomez⁴, E. K. Apartsin^{1,2}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

² *Novosibirsk State University*

³ *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk*

⁴ *Department of Organic and Inorganic Chemistry,
University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain*

E-mail: v.arkhipova@g.nsu.ru

Аннотация

Работа направлена на получение наноразмерных везикул и исследование их свойств. Изучено взаимодействие наночастиц с противоопухолевыми препаратами и терапевтическими нуклеиновыми кислотами. Исследована эффективность доставки комплекса с лекарством в клетки.

© В. И. Архипова, Н. Ю. Кнауэр, Е. А. Пашкина, О. С. Боева, А. Г. Веньямина, Х. Санчес-Ньевес, Ф. Х. де ла Мата, Р. Гомес, Е. К. Апарцин, 2020

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 18-33-20109_мол_а_вед, гранта MINECO CTQ-2017-85224-P, гранта Президента РФ МК-2278.2019.4.

Abstract

This work is aimed at obtaining and studying the properties of nanoscale vesicles. The interaction of nanoparticles with anticancer drugs and therapeutic nucleic acids was studied. The efficiency of drug delivery into cells was studied.

Супрамолекулярные конструкции часто используются в качестве доставщиков лекарственных препаратов, так как инкапсуляция терапевтических агентов в наноразмерные ассоциаты с последующим контролируемым высвобождением в клетках-мишенях позволяет увеличить эффективность лекарства и снизить побочный токсический эффект.

Многообещающими структурными блоками для НЧ являются высоко-симметричные молекулы — дендримеры и дендроны. Этот тип полимеров выгодно отличается регулярностью структуры и возможностью контролируемого синтеза. В данной работе была синтезирована серия новых амфифильных дендритных молекул — гибридных триазин-карбосилановых дендронов. Наличие разветвленного гидрофобного блока стимулирует самосборку молекул в устойчивые двухслойные ассоциаты (дендримеросомы).

Дендримеросомы с высокой эффективностью инкапсулируют низкомолекулярные химиопрепараты, такие как доксорубин и метотрексат; красители метиленовый синий и бенгальский розовый. Препарат-содержащие конструкции имеют гидродинамический размер 60–100 нм (PDI 0,19–0,25) и суммарный заряд $\sim +15$ мВ. На примере доксорубин-содержащих дендримеросом было показано, что конструкции накапливаются в клетках-мишенях в течение 4 ч совместной инкубации и вызывают гибель клеток в течение 24–72 ч.

Дендримеросомы также показали эффективность в доставке противоопухолевых НК (miR-34a, anti-miR-21) в опухолевые клетки. Комплексы дендримеросом с олигонуклеотидами (400–500 нм) эффективно проникают в опухолевые клетки как адгерентных, так и суспензионных линий, вызывая апоптоз.

Таким образом, амфифильные триазин-карбосилановые дендроны можно рассматривать как перспективную платформу для доставки низко- и высокомолекулярных лекарственных препаратов в клетки.

**НАЛИЧИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ
МАРКЕРАМИ ДОМЕНА DBL1 α И DBL β ГЛАВНОГО ФАКТОРА
ВИРУЛЕНТНОСТИ *PLASMODIUM FALCIPARUM* (PFEMP1)
В СЛУЧАЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ ТРОПИЧЕСКОЙ МАЛЯРИИ**

THE INTERRELATION OF DBL1 α AND DBL β GENETIC MARKERS
OF THE *PLASMODIUM FALCIPARUM* ERYTHROCYTE MEMBRANE
PROTEIN 1 (PFEMP1) IN THE CASE OF SEVERE TROPICAL MALARIA

А. Р. Арюков, А. И. Ракин

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

A. R. Ariukov, A. I. Rakin

Military Medical Academy named after S. M. Kirov, St. Petersburg

E-mail: Arukov.artem@yandex.ru

Аннотация

Проведено исследование генотипических особенностей *Plasmodium falciparum*, вызывающих тропическую малярию, осложненную гемолитической анемией. Показано, что в случае тяжелой тропической малярии, сопровождавшейся развитием гемолитической анемии, в крови пациента выявлялись генетические маркеры PFEMP1, соответствующие доменам DBL1 α и DBL β . В случае неосложненного течения тропической малярии данные генетические маркеры отсутствовали.

Abstract

The work is dedicated to the study of the genetic characteristics of *Plasmodium falciparum*. Material for clinical studies are two cases of tropical malaria diagnosed between September and October 2018 year in St. Petersburg hospitals. One case of the disease flowed had and has been accompanied by severe anemia. Another case of the disease was proceeding without complications. Routine polymerase chain reaction (PCR) was used to research. PCR was performed with primers to genes encoding the domains DBL1 α , DBL β of PFEMP1. PCR with primers to DBL1 α and DBL β were positive in the case of hemolytic anemia.

Одним из наиболее частых признаков злокачественного течения тропической малярии служит гемолитическая анемия вследствие разрушения эритроцитов в процессе эритроцитарного цикла развития паразитов. Однако выраженность признаков анемии не всегда напрямую зависит от уровня паразитемии. Клинических наблюдений, подтверждающих связь между развитием тяжелой анемии с особенностями строения генома *P. falciparum*, пока недостаточно.

Цель работы. На примере клинических наблюдений подтвердить возможную связь клинических проявлений тропической малярии с особенностями генотипа возбудителей (*P. falciparum*).

Материалом для клинических наблюдений послужили два случая тропической малярии, выявленных в стационарах Санкт-Петербурга. В одном из случаев заболевание протекало тяжело и сопровождалось развитием тяжелой анемии. Другой случай заболевания протекал без осложнений.

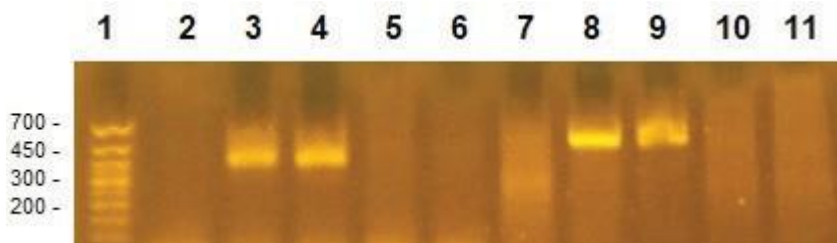
В ходе исследований мы использовали технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР). Материалом служила высушенная кровь со стеклов, приготовленных для препарата «толстая капля».

В результате проведенного микроскопического исследования препаратов «толстая капля» и «тонкий мазок» в крови пациента В. и пациента М. были выявлены юные трофозоиты *P. falciparum*. Концентрация паразитов в обеих пробах составила более 5000 паразитов в 1 мкл крови.

Результаты ПЦР с видоспецифичными праймерами подтвердили присутствие в пробах крови пациентов В. и М. нуклеотидных последовательностей, характерных для генома *P. falciparum*.

Исследование проб с использованием праймеров к различным регионам *var*-комплекса *P. falciparum* показало, что реакции с кровью пациента В. давали положительные результаты на нуклеотидные последовательности, соответствующие как домену DBL1 α , так и домену DBL β . В тоже время соответствующие исследования образцов крови пациента М. показали отрицательный результат (см. рисунок).

Таким образом, заболевание тропической малярией пациента В., при котором выявлялись генетические маркеры PFEMP1, соответствующие доменам DBL1 α и DBL β , сопровождалось развитием осложнений — гемолитической анемии и острого почечного повреждения. При этом клинические проявления характеризовались субъективными ощущениями тошноты, выраженной слабости, головной боли, а также объективными признаками желтушности кожи и склер, гепато- и спленомегалии.



Результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации с праймерами к нуклеотидным последовательностям доменов DBL1 α и DBL β : 1 — маркер длин ДНК (50+ bp); 2–6 — праймеры DBL α -5'/DBL α -3' (домен DBL1 α); 7–11 — праймеры DBL β -5'/DBL β -3' (домен DBL β); 2, 7 — проба от здорового донора; 3, 4, 8, 9 — проба от больного В.; 5, 6, 10, 11 — проба от больного М.

**ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HAP1 С АУКСИН-ЗАВИСИМОЙ
ДЕГРАДАЦИЕЙ КОНДЕНСИНОВ И КОГЕЗИНА****CREATING A HAP1 CELL LINE WITH AUXIN-INDUCIBLE
CONDENSINS AND COHESIN DEPLETION**

С. Д. Афонникова

*Новосибирский государственный университет
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

S. D. Afonnikova

*Novosibirsk State University
Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: svetaafonnikova@gmail.com

Аннотация

Конденсины и когезин принадлежат к группе SMC-белков (Structural Maintenance of Chromosomes), которые взаимодействуют с хромосомами на протяжении всего клеточного цикла, а также участвуют в контроле активности генов. Для исследования функции этих белков мы создали клеточные линии, позволяющие быстро и полно проводить деплецию конденсинов и когезина.

Abstract

Condensins and cohesin belong to the SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) proteins family, which interact with chromosomes throughout cell cycle and involved in control of gene activity. To study function of these proteins we created cell lines with rapid and extensive depletion of condensins and cohesin.

Многочисленные исследования в области трехмерной организации хроматина в ядре показали иерархичность укладки хромосом. Они формируют компартменты, состоящие из топологически ассоциированных доменов (ТАДов), образование которых происходит благодаря механизму экстрезии петли через белковый комплекс когезина.

Эксперименты по удалению какой-либо субъединицы когезина привели к потере петель и доменов. При это отмечено, что экспрессия генов карди-

нально не меняется. Это может быть свидетельством существования других компонентов, которые поддерживают устойчивость энхансер-промоторных взаимодействий. Подходящими кандидатами для исполнения подобных функций являются комплексы конденсина, также способные к экстремизации хроматиновых петель.

Исследование роли обозначенных выше белков в контроле активности генов проводилось путем ауксин-зависимой деградации белка, которая позволяет направленно и обратимо снизить количество белка $< 5\%$ от начального в присутствии ауксина. Для работы были выбраны следующие субъединицы: Rad21 когезина и SMC2 конденсинов 1 и 2. Модификация генов осуществлялась системой CRISPR/Cas9.

В результате работы были получены линии клеток с ауксин-зависимой деградацией когезина (23R), конденсинов 1 и 2 (48S), одновременно когезина и конденсинов (23RS). Также было проведено исследование динамики деградации во времени. Согласно полученным данным после шести часов уровень деградации у линий 23R и 48S составил 20–30%. У линии 23RS уровень ниже — до 7%.

**ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И SNP-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ
ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВЕТВИ
2.MED4 СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА**

GENOME ANALYSIS AND SNP-GENOTYPING OF *YERSINIA PESTIS*
STRAINS OF THE PHILOGENETIC BRANCH 2.MED4
OF MEDIEVAL BIOVAR

А. Н. Балькова, Г. А. Ерошенко

*Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб», Саратов*

A. N. Balykova, G. A. Eroshenko

Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe»

E-mail: alinabalnik@gmail.com

Аннотация

В XVIII–XX веках в Прикаспии происходили многочисленные вспышки чумы с высоким уровнем летальности. Нами выявлена неизвестная ранее филогенетическая ветвь 2.MED4 *Yersinia pestis* средневекового биовара. Штаммы ветви 2.MED4 могли быть этиологическими агентами этих вспышек наряду с другой ветвью 2.MED1. Целью исследования было проведение сравнительного геномного анализа штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 2.MED4 и выявление молекулярно-генетических особенностей для разработки способа их идентификации методом ПЦР.

Abstract

In the XVIII–XX centuries, numerous outbreaks of plague with a high mortality rate occurred in the Caspian-Sea region. We have identified a previously unknown phylogenetic branch 2.MED4 *Yersinia pestis* of the medieval biovar. The strains of the branch 2.MED4 could be the causative agents of these outbreaks, along with another branch 2.MED1 of *Y. pestis*. The aim of this study was to carry out a comparative genomic analysis of *Y. pestis* strains of the phylogenetic branch 2.MED4 and to identify the molecular-genetic features for the development of a method for their identification by PCR.

В конце XVIII — начале XX веков в Прикаспии на территории России и Казахстана происходили многочисленные вспышки чумы, этиологический агент которых был неизвестен. Нами доказано, что по крайней мере с начала XX века вспышки в северной части Прикаспия были вызваны штаммами *Y. pestis* филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара, возможно, в них принимали участие и высоковирулентные штаммы выявленной нами филогенетической ветви 2.MED4 [2, 3]. Эти сведения определяют актуальность проведения сравнительного геномного анализа штаммов 2.MED4 и выявления их молекулярно-генетических особенностей для последующего определения роли этих штаммов во вспышках чумы в Прикаспии.

Сравнительный геномный анализ трех ранее выявленных штаммов *Y. pestis* ветви 2.MED4 проводили в программах Mega X, MUMmer3.0, по результатам анализа найдено 10 маркерных SNPs. Были отобраны три таргетные SNPs в белок-кодирующих генах по геному референсного штамма CO92: *priA* (A → G в позиции 117694 гена YPO0110), *apaH* (C → A в позиции 522489 гена YPO0490), *phnL* (G → A в позиции 3869329 гена YPO3462). Фрагментное секвенирование осуществляли на анализаторе «AppliedBiosystems 3500xL». SNP-генотипирование методом ПЦР и фрагментного секвенирования выполнено на выборке из 26 штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Прикаспия, соответствующих периодам выделения ранее исследованных штаммов ветви 2.MED4. Найдено еще 5 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, относящихся к данной ветви.

Высокопроизводительное секвенирование всех 8 штаммов ветви 2.MED4 проводили в системе Ion PGM (Life technologies). Обработку данных секвенирования выполняли в программах Ion Torrent Suite software 4.2 и Newbler gsAssembler 2.6. Выравнивание полученных прочтений на референсный геном штамма *Y. pestis* CO92 (номер доступа в GenBank NC_003143.1) осуществляли с помощью DNASTAR Lasergene 15.3. Средний размер собранных геномов составил 4, 5 м. п. н., средняя глубина покрытия — 48-кратная. Нуклеотидная последовательность штамма *Y. pestis* 31 ветви 2.MED4 депонирована в базу данных NCBI GenBank под номером JAAIKY000000000.

По результатам сравнительного анализа геномов 8 штаммов ветви 2.MED4 выявлено 10 маркерных SNPs и разработан способ их идентификации методом ПЦР и фрагментного секвенирования. Полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis* ветви 2.MED4 могут быть использованы в качестве референсных для природных очагов чумы Прикаспия.

Литература

1. Kuttyrev V. V. et al. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States // Front. Microbiol. 2018. Vol. 9(1106). 1–11. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
2. Eroshenko G. A. et al. Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural Sandy focus: spatiotemporal analysis // Problems of Particularly Dangerous Infections. 2019. Vol. 3. P. 51–57. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57.
3. Eroshenko G. A. et al. Phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains of medieval biovar, isolated in Precaspian North-Western Steppe plague focus in the XX century // Problems of Particularly Dangerous Infections. 2019. Vol. 2. P. 55–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-55-61.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА GNR-084 МЕТОДОМ ИММУНО-ПЦР

DETECTION OF RECOMBINANT BISPECIFIC PROTEIN GNR-084 BY IMMUNO-PCR

Е. Ю. Басова, Н. А. Литвинова, О. А. Саввина, Р. Р. Шукуров

ООО МБЦ «Генериум», Москва

E. Yu. Basova, N. A. Litvinova, O. A. Savvina, R. R. Shukurov

ООО МБЦ "Generium", Moscow

E-mail: eybasova@ibcgenerium.ru

Аннотация

Количественное определение рекомбинантного биспецифического антитела в низких дозировках является важной задачей при проведении доклинических (ДоКИ) и клинических исследований (КИ). Целью данного исследования являлась разработка высокочувствительного метода иммуно-ПЦР (и-ПЦР) для детектирования рекомбинантного биспецифического антитела GNR-084 в образцах сыворотки крови человека. Ключевым элементом разработанного метода является использование конъюгата анти-Fab-GNR-084 антител с олигонуклеотидами с последующей амплификацией в режиме реального времени. Данный подход позволил достичь предела количественного обнаружения лекарственной формы GNR-084 в лиофилизате после восстановления и разведения в 0,9 % NaCl для проведения инфузии 12,5 пг/мл. Полученные результаты открывают возможность детектирования данного лекарственного средства в низких концентрациях при проведении ДоКИ и КИ.

Abstract

The quantitative determination of recombinant bispecific antibodies at low dosages is an important task in pre-clinical and clinical studies. The aim of this study is to develop a highly sensitive method of immuno-PCR for detection of recombinant bispecific antibody GNR-084 in serum. The key element of developed method is using a conjugate anti-Fab-GNR-084 antibody with oligonucleotides and followed by real-time amplification. This approach allowed us to achieve a detection limit of 12.5 pg / ml for the solution of GNR-084 that had been reconstituted from the lyophilized form in a solution of 0.9 % NaCl

for infusion at 12.5 pg / ml. The obtained results point to the possibility of detecting this drug at low concentrations during DoCI and CI.

Введение

На сегодняшний день проблема острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) как в детском, так и подростковом возрасте все еще остается нерешенной [1]. Доля ОЛЛ составляет 25 % всех злокачественных заболеваний и до 75 % всех гемобластозов. Лекарственные препараты на основе рекомбинантных биспецифических антител имеют важное значение в мобилизации и усилении Т-клеточного иммунного ответа организма против злокачественных В-клеточных опухолей лимфоидного происхождения. В связи с этим на базе ООО МБЦ «Генериум» разработан препарат, который представляет собой биспецифические антитела GNR-084. Молекула антител GNR-084, содержащая Fc регион антител человека, способна одновременно специфично взаимодействовать с CD19 и CD3. Препарат успешно прошел ДоКИ и находится на стадии КИ, в ходе которых необходимо детектировать низкие дозировки препарата в сложных биологических матрицах образца. Существуют различные методы определения, среди которых широкое распространение получил иммуноферментный анализ (ИФА) [2]. Однако чувствительность метода не позволяет применять его для детекции аналитов в сверхнизких количествах. Объединение специфичного ИФА и высокочувствительного ПЦР в методе и-ПЦР обуславливает 10–10 000 кратное увеличение чувствительности за счет использования фрагмента ДНК в качестве метки для детектирования взаимодействия антитело-антиген [3].

Целью настоящей работы является разработка метода и-ПЦР для количественного определения молекулы GNR-084 в сыворотке крови человека.

Материалы и методы

Методом количественной и-ПЦР определяли содержание GNR-084 в образцах сыворотки крови человека. Эксперименты проводились с модельными образцами и с образцами сыворотки (S1 Merck Millipore), которую предварительно центрифугировали в течение 5 минут при 14000 об/мин, затем фильтровали через фильтр Millex-GP, 0,22 мкм, после чего смешивали с буферным раствором для разведения образцов (RDB) в соотношении 1:5. Раствор инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре и снова центрифугировали. Детектирование происходило следующим образом: на поверхность планшета (Maxisorp, NUNC) иммобилизовали поликлональные красные анти-Fab-GNR-084 антитела (МБЦ «Генериум»), после удаления несвязавшихся антител и блокировки вносили образец,

содержащий GNR-084, по завершении инкубации и промывки добавляли конъюгат поликлональных крысиных анти-Fab-GNR-084 антител с олигонуклеотидами (МБЦ «Генериум»). Завершающим этапом было проведение денатурации иммунокомплекса с помощью ТЕ буфера при нагревании 95 °С в течение 5 минут с последующим переносом смеси в ПЦР планшет и амплификацией. Схема анализа представлена на рис. 1.

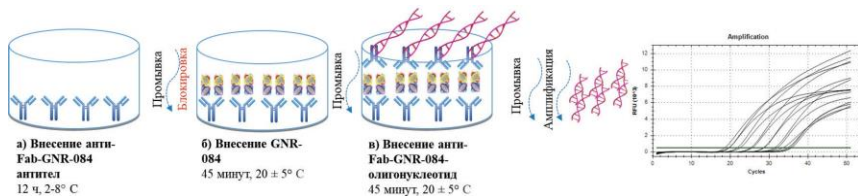


Рис. 1. Схема проведения и-ПЦР для определения GNR-084

ПЦР в реальном времени проводили в программируемой 6-канальной оптической системе термоблока амплификатора CFX-96 (BioRad, Германия). Реакционную смесь готовили с использованием следующих реагентов: праймеров 5'-ATTGTTGCCCCAAGCTAGAGTAAGTAGTT-3'; 5'-TATGCAGTGCTGCCATAACCATGA-3' (Синтол) и ДНК-полимеразы qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Амплификацию проводили согласно следующей схеме:

Стадия	Время	Температура, °С	Количество циклов
Активация полимеразы	5 мин	95	1
Денатурация	12 с	95	40
Отжиг	30 с	50	
Элонгация	30 с	72	

Флюоресценцию измеряли на каждом цикле на фазе элонгации. Статистическая обработка осуществлялась с использованием программ Microsoft Office Excel 2010 [4–8].

Результаты и обсуждение

Количественное определение рекомбинантных биспецифических антител в низких дозировках является одной из важных задач при проведении

ДоКИ и КИ. В связи с этим нами был разработан метод на основе и-ПЦР, ключевыми стадиями которого являются:

- 1) иммобилизация антител на твердой фазе (рис. 1, а);
- 2) связывание антител с анализом GNR-084 (рис. 1, б);
- 3) образование и отмывка сэндвича-комплекса (рис. 1, в);
- 4) денатурация сэндвич-комплекса и перенос в ПЦР-планшет;
- 5) удлинение, амплификация и детекция ПЦР-продукта.

В данном исследовании в качестве твердой фазы нами были протестированы три разных подложки: 1) стандартные планшеты для ИФА Nunc MaxiSorp, 2) стрипы Top Yield (компания Nunc) и 3) 96-луночные для ПЦР (Microamp TM Barcode). Для каждого раствора антител подбирали соответствующий буферный раствор: 1) фосфатносолевой буфер, 2) трис-буферный солевой раствор и 3) фосфатносолевой-БСА-ДНК лосося буферный раствор [9]. Раствор антител вносили в лунки планшета, инкубировали 16 ч при +4 °С. Затем проводили и-ПЦР согласно ранее описанной схеме.

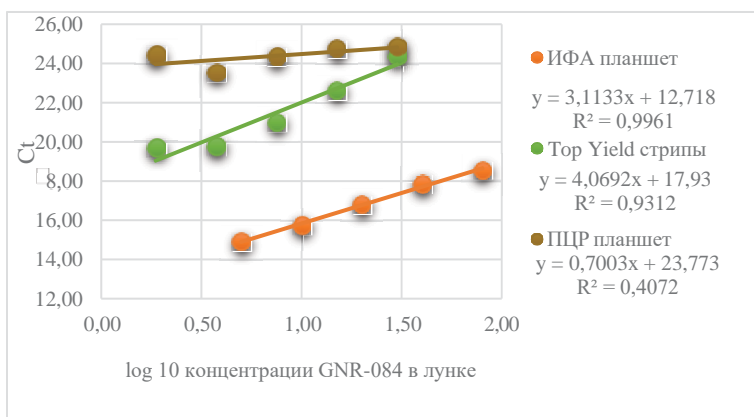


Рис. 2. Результат определения GNR-084 в модельных растворах при использовании различных твердых фаз для формирования иммуно-комплекса

Из полученных данных следует, что при использовании ИФА планшета наблюдается повышенная сорбционная емкость антител по сравнению с другими (рис. 2).

Для повышения чувствительности и снижения фонового шума проведена оптимизация концентрации конъюгированных антител с ДНК-меткой,

блокирующих растворов и этапов промывки [10]. В результате этого предел количественного определения GNR-084 в лиофилизате после восстановления и разведения в 0,9 % NaCl для проведения последующей инфузии составил 12,5 пг/мл и в образцах сыворотки 0,8 нг/мл (рис. 3).

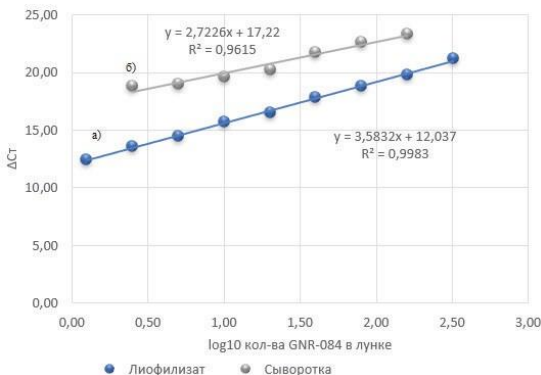


Рис. 3. Результаты определения GNR-084 в восстановленном лиофилизате (а) и в растворе сыворотки (б)

Выводы

Разработанный метод позволяет детектировать GNR-084 в восстановленном лиофилизате на уровне 12,5 пг/мл. Тем не менее предел количественного определения в образцах сыворотки крови человека составил 0,8 нг/мл. Таким образом, необходима дополнительная оптимизация метода с целью понижения предела обнаружения; в последующих экспериментах планируется также определение GNR-084 в клинических образцах пациентов.

Литература

1. Литвинов Д. В., Карелин А. Ф., Романова К. И., Румянцева Ю. В., Карачунский А. И. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы // *Pediatric Hematology/Oncology*. 2015. № 10. С. 111.
2. Muller D., Karle A., Meißburger B., Hofig I., Stork R., Kontermann R.E. Improved Pharmacokinetics of Recombinant Bispecific Antibody Molecules by Fusion to Human Serum Albumin // *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2007. Vol. 282. No. 17. P. 12650–12660.
3. Маерле А. В., Сергеев И. В., Алексеев Л. П. Метод иммуно-ПЦР: перспективы использования // *Иммунология*. 2014. № 1. С. 44–48.

4. ГОСТ Р ИСО 11843-2-2007 Статистические методы. Способность обнаружения. Ч. 2. Методология в случае линейной калибровки.

5. ОФС.1.7.2.0013.15 Полимеразная цепная реакция // Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (2 ч).

6. Adler M., Langer M., Witthohn K., Wilhelm-Ogunbiyi K., Schöffski P., Fumoleau P., Niemeier C. M. Adaptation and performance of an immuno-PCR assay for the quantification of Aviscumine in patient plasma samples // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005. Vol. 39. P.972–982

7. Barletta J. Applications of real-time immuno-polymerase chain (rt-IPCR) for the rapid diagnoses of viral antigens and pathologic proteins // Mol. Aspects Med. 2006. Vol. 27. P. 224–253.

8. Crowther J.R. ELISA: Theory and Practice. Humana Press. Inc. Effective Blocking Procedures // ELISA Technical Bulletin. 1995. №3.

9. Abud J. E., Santamaría C. G., Oggero M., Rodriguez H. A. Methodological aspects of Universal immuno-PCR on standard tubes // Analytical Biochemistry. 2019. Vol. 570. P. 56–61.

10. Basova E. Yu., Goryacheva I. Yu., Rusanova T. Yu., Burmistrova N. A., Dietrich R., Märthlbauer E., Detavernier Ch., Van Peteghem C., De Saeger S. An immunochemical test for rapid screening of zearalenone and T-2 toxin // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010. Vol. 397. P.55–62.

**ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ПРОЦЕДУРЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ
КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
НА ПОКАЗАТЕЛИ ДНК-КОМЕТ**

**A STUDY OF THE EFFECTS OF CRYOPRESERVATION OF HUMAN
PERIPHERAL BLOOD CELLS ON DNA COMET ASSAY PARAMETERS**

С. Н. Бах, Е. А. Щетникова

*Институт биологии, экологии и природных ресурсов
Кемеровского государственного университета*

S. N. Bach, E. A. Schetnikova

Institute of Biology, Ecology and Natural Resources Kemerovo State University

E-mail: sebastianbah430@gmail.com

Аннотация

Хранение, транспортировка клеток и манипуляции с ними сопровождаются риском повреждения ДНК, что приводит к ограничениям в использовании их в исследованиях. Решение данной проблемы — криоконсервация. Сравнение образцов клеток показало снижение доли ДНК в хвосте комет (%ТДНК), замороженных при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1,45 %) и при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1,29 %) в сравнении с контролем (1,86 %).

Abstract

Cell's storage, transportation and manipulation are accompanied by DNA damage risk, which leads to limitations in their use in research. The solution — cryopreservation. Samples comparison showed that DNA Tail Intensity, % (TI) in cryopreserved cells at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1,45 %) and at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1,29 %) decreases, in compare with control group (1,86 %).

Криоконсервация давно применяется для сохранения биоматериалов. Однако ее механизмы и влияние на ДНК недостаточно изучены и требуют дальнейших исследований в целях определения эффективности данного метода.

В качестве материала исследования использовалась цельная венозная кровь шести здоровых людей. Для безопасной заморозки использовался ДМСО 10 %. Цельная кровь замораживалась при температурах $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

и -196°C на периоды 1, 2 и 4 недели. Разморозка осуществлялась быстро в воде 37°C . Оценка фрагментации ДНК проводилась методом ДНК-комет в щелочной модификации.

Криоконсервация цельной крови не привела к значимому увеличению параметра %ТДНК. Наблюдалось снижение показателей в замороженных образцах по сравнению с контролем, как при -80°C для показателя %ТДНК (1,45 % [1,36–1,54]), так и при -196°C для показателя %ТДНК (1,29 % [1,22–1,37], по сравнению с контролем 1,86 % [1,79–1,92], $p < 0,01$).

На основе результатов исследования был сделан вывод, что криоконсервация пригодна для продления срока хранения биоматериалов без вреда для ДНК. Это обуславливает возможности применения криоконсервированных клеток в медицинских и генетических исследованиях.

РАЗРАБОТКА ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ 3CL SARS-CoV-2 *

DEVELOPMENT OF THE PROKARYOTIC EXPRESSION SYSTEM OF THE MAIN PROTEASE 3CL SARS-CoV-2

С. В. Беленькая^{1,2}, Д. В. Шаньшин¹, Д. Н. Щербаков^{1,3},
О. И. Яровая⁴, С. З. Вацадзе⁵

¹ Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

² Новосибирский государственный университет

³ Алтайский государственный университет, Барнаул

⁴ Новосибирский институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

⁵ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

S. V. Belenkaya^{1,2}, D. V. Shanshin¹, D. N. Shcherbakov^{1,3},
O. I. Yarovaya⁴, S. Z. Vatsadze⁵

¹ State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

² Novosibirsk State University

³ Altai State University, Barnaul

⁴ N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS

⁵ N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: belenkaya.sveta@gmail.com

Аннотация

SARS-CoV-2 3CL — это цистеиновая протеаза, участвующая в протеолитическом расщеплении вирусного полипротеина до ряда функциональных белков, необходимых для его репликации. Данный фермент считается привлекательной мишенью для разработки агентов против новой коронавирусной инфекции. В результате проделанной работы было разработано четыре варианта рекомбинантных векторов, рЕТ21-3CLV, рЕТ21-3CL, рЕТ21-MBP-3CL и рЕТ21-GST-3CL, обеспечивающих синтез данной протеазы в клетках *E. coli*.

© С. В. Беленькая, Д. В. Шаньшин, Д. Н. Щербаков, О. И. Яровая, С. З. Вацадзе, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-6015 Вируссы.

Abstract

SARS-CoV-2 3CL is a cysteine protease involved in the proteolytic cleavage of the viral polyprotein into a number of functional proteins required for its replication. This enzyme is considered an attractive target for the development of agents against the novel coronavirus infection. As a result of the work done, four variants of recombinant vectors, pET21-3CLV, pET21-3CL, pET21-MBP-3CL and pET21-GST-3CL, were developed, which provide the synthesis of this protease in the *E. coli* cell.

Цель данной работы — разработка рекомбинантных векторов, обеспечивающих синтез протеазы SARS-CoV-2 3CL в прокариотической системе экспрессии для изучения ее функций и структуры, а также для тестирования соединений-ингибиторов. Для достижения поставленной цели использовали два варианта нуклеотидных последовательностей, кодирующих 3CL, на их основе было проведено проектирование нескольких экспрессионных векторов, содержащих этот ген. С помощью ОТ-ПЦР с матрицы вирусной РНК с использованием праймеров 3CLV-F (aaaaaaggatccagtggttttagaaaaatggcattcc) и 3CLV-R (aaaaaactcgagttgaaagtaacacctgagcattg) была получена нуклеотидная последовательность нативной вирусной протеазы SARS-CoV-2 3CL, которая была клонирована по уникальным сайтам рестрикции (BamHI/Sfr274I) в составе экспрессионного вектора pET21a. Второй вариант нуклеотидной последовательности, кодирующий вирусную протеазу, был оптимизирован под экспрессию в системе *E. coli* и синтезирован на заказ в составе экспрессионного вектора pET21a. Последовательности мальтоза-связывающего белка и глутатион S-трансферазы были амплифицированы с помощью пары праймеров 3CL-M-F (5'-aaaaaacatatgaaaactgaagaaggtaaactggaat-3') 3CL-M-R (5'-aaaaaaggatccacctgaaaataaagattttctcctgatggtgatggtgatgccttcctcgatcc-3') и 3CL-G-F (5'-aaaaaacatatgtcccctatactaggtatt-3') 3CL-G-R (5'-aaaaaaggatccttttgaggatggtcgccac-3') соответственно. После апликоны были клонированы в состав вектора pET21-3CL по уникальным сайтам рестрикции (FauNDI/BamHI). В результате нами были сконструированы четыре варианта рекомбинантных векторов, pET21-3CLV, pET21-3CL, pET21-MBP-3CL и pET21-GST-3CL, обеспечивающих синтез вирусной протеазы SARS-CoV-2 3CL.

Был проведен сравнительный анализ уровня экспрессии целевого белка в клетках *E. coli* штамма B121, трансформированных разработанными рекомбинантными векторами. Анализ показал, что клетки, трансформированные плазмидой pET21-GST-3CL, обеспечивают наибольший синтез целевого белка в растворимой форме.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ*

THE USING OF MODEL SYSTEMS TO STUDY HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

А. А. Богданова ^{1,2}, Н. Н. Немова ¹, Т. О. Волкова ²

¹ *Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*

² *Петрозаводский государственный университет*

A. A. Bogdanova ^{1,2}, N. N. Nemova ¹, T. O. Volkova ²

¹ *Institute of Biology Karelian Research Centre RAS*

² *Petrozavodsk State University*

E-mail: arinabogdanova94@mail.ru

Аннотация

3D-модели активно применяются для изучения молекулярных особенностей опухолей различных локализаций, а также подбора новых лекарственных препаратов и терапий. В работе представлены некоторые разновидности 3D-моделей, применяемые для изучения плоскоклеточного рака головы и шеи.

Abstract

3D models are actively used to study the molecular features of tumors of various localities and the selection of new drugs and therapies. This paper presents some types of 3D models used to study head and neck squamous cell carcinoma.

Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) представляет собой гетерогенную группу опухолей и составляет около 85 % всех опухолей головы и шеи (ОГШ). По факторам риска ПРГШ делят на две группы — ВПЧ-позитивный (ВПЧ+) рак, связанный с вирусом папилломы человека, и ВПЧ-негативный (ВПЧ-) рак, ассоциированный со злоупотреблением алкоголем и курением.

© А. А. Богданова, Н. Н. Немова, Т. О. Волкова, 2020

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ГБТ № АААА-А20-120070290151-6.

Модельные системы активно применяются для изучения молекулярных особенностей ПРГШ и подбора стратегий лечения. В основном используются 3D-модели, которые лучше отражают сложность новообразования по сравнению с 2D-клеточными культурами. Существуют различные типы 3D-моделей, но наиболее востребованной разновидностью являются сфероиды, разработанные для воссоздания условий роста *in vivo*, гетерогенности популяции опухолевых клеток и взаимодействия опухоли с микроокружением. Сфероиды по сравнению с 2D-культурами содержат в себе несколько разновидностей клеток и демонстрируют профили экспрессии генов, аналогичные опухолям организма. Поскольку сфероиды по некоторым характеристикам сопоставимы с опухолями *in vivo*, они часто используются для апробации новых препаратов для химиотерапии. В исследовании M. Santi сфероиды, образованные клетками ВПЧ+ и ВПЧ — ПРГШ, используются для изучения свойств наноматериалов, содержащих платину (IV) в качестве альтернативы соединениям с платиной (II) при химиотерапии [1].

Еще одной используемой моделью являются ксенографты, полученные из опухолевого материала пациентов, в мышцах с иммунодефицитом. Ксенографты активно применяются в связи с тем, что являются более точной моделью опухолей человека по сравнению с опухолями мышей или клеточными линиями, трансплантированными мышам. Чаще всего такие модели используются для определения эффективности новых противоопухолевых препаратов, выбора стратегии лечения, а также преодоления резистентности к лекарствам. В исследовании S. Bhatia такая модель использовалась для изучения EphB4-Ephrin-B2 сигнального пути и его влияния на комбинированную терапию цетуксимабом, ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Было установлено, что после ингибирования EphB4-Ephrin-B2 наблюдалось увеличение выживаемости мышей с ПРГШ, посредством усиления чувствительности как к ингибитору EGFR, так и лучевой терапии [2]. Ксенографты используются и для изучения процессов, связанных с ростом опухоли и метастазированием, так, например, в работе Z. Zhuang рассматривалась взаимосвязь агрессивности ОГШ и экспрессии микроРНК (miR). Было установлено, что при ПРГШ наблюдается снижение экспрессии miR-204-5p, выступающей в качестве супрессора опухолей, способного ингибировать рост и метастазирование. miR-204-5p подавляет эпителиально-мезенхимальный переход и сигнальный путь STAT3[3].

Таким образом, 3D-модели, такие как ксенографты и сфероиды, занимают важное место в исследованиях ПРГШ, что дает возможность не только подобрать новые препараты для терапии, но и определить некоторые молекулярные особенности патологии.

Литература

1. Santi M. et al. Endogenously-Activated Ultrasmall-in-Nano Therapeutics: Assessment on 3D Head and Neck Squamous Cell Carcinomas // *Cancers*. 2020. Vol. 12. №. 5. P. 1–12.
2. Bhatia S. et al. Inhibition of EphB4–Ephrin-B2 Signaling Enhances Response to Cetuximab–Radiation Therapy in Head and Neck Cancers // *Clinical Cancer Research*. 2018. Vol. 24. №. 18. P.4539–4550.
3. Zhuang Z. et al. MicroRNA-204-5p is a tumor suppressor and potential therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma // *Theranostics*. 2020. Vol. 10. №. 3. P. 1433–1453.

**ТРАНСЛЕЗИОННАЯ АКТИВНОСТЬ PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА
НА ДНК-МАТРИЦАХ С N2-АДДУКТАМИ ГУАНИНА *****TRANSLESION DNA SYNTHESIS BY HUMAN PRIMPOL
ON DNA TEMPLATES CONTAINING N2-GUANINE ADDUCTS**

Е. О. Болдинова¹, П. П. Г. Годке², А. В. Макарова¹,
П. И. Прадеепкumar², Н. А. Мирославская¹

¹ *Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт», Москва*

² *Индийский институт технологий, Бомбей, Индия*

E. O. Boldinova¹, P. P. G. Ghodke², A. V. Makarova¹,
P. I. Pradeepkumar², N. A. Miropolskaya¹

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow*

² *Indian Institute of Technology Bombay, India*

E-mail: lizaboldinova@yandex.ru

Аннотация

В данной работе проанализирована транслезионная ДНК-полимеразная активность PrimPol на ДНК-матрицах, содержащих объемные повреждения ДНК N2-аддукты гуанина: N2-этил-Г, N2-изобутил-Г, N2-бензил-Г, N2-метил(1-нафтил)-Г, N2-метил(9-антраценил)-Г, N2-метил(1-пиренил)-Г, N2-метил(1,3-диметоксиантрахинон)-Г. Показано, что ионы Mn²⁺ и репликативные факторы PolDIP2 и RPA стимулируют способность PrimPol «проходить» объемные повреждения ДНК.

Abstract

We studied translesion DNA synthesis by human PrimPol on DNA templates containing bulky N2-dG adducts: N2-ethyl-dG (N2-Et-dG), N2-izobutil-dG (N2-Ib-dG), N2-benzyl-dG (N2-Bz-dG), N2-methyl(1-naphthyl)-dG (N2-Naph-dG), N2-methyl(9-anthracenyl)-dG (N2-Anth-dG), N2-methyl(1-pyrenyl)-dG (N2-Pyre-dG), N2-methyl(1,3-dimethoxyanthraquinone)-dG (LdG). We found that Mn²⁺ ions and replication factors PolDIP2 and RPA stimulate PrimPol to bypass bulky DNA adducts.

© Е. О. Болдинова, П. П. Г. Годке, А. В. Макарова, П. И. Прадеепкumar, Н. А. Мирославская, 2020

* The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-54-45035.

PrimPol is an important piece of an elaborate puzzle of the genome integrity maintenance. PrimPol's primase activity is involved in a reinitiation of a DNA synthesis at stalled replication forks and its DNA-polymerase activity plays a role in a translesion synthesis (TLS) past DNA damage. A number of DNA lesions have been studied to be tolerated by PrimPol but there are much more of the lesions presented in the genome PrimPol may encounter. We investigated PrimPol TLS-activity on a wide range of N2-dG adducts of different bulkiness and analyzed an effect of the auxiliary proteins PolDIP2 and RPA on PrimPol TLS-activity on these lesions. We demonstrated that in the presence of Mg^{2+} ions PrimPol incorporates correct dCTP opposite N2-ethyl-dG (N2-Et-dG) adduct but extension from the lesion is hampered. PolDIP2 and RPA stimulate the efficiency of nucleotide incorporation by PrimPol on undamaged template and on N2-Et-dG adduct. N2-dG adducts of N2-izobutil-dG (N2-Ib-dG) size and bulkier block TLS-activity of PrimPol in the presence of Mg^{2+} ions. In the presence of Mn^{2+} ions PrimPol recovers its TLS-activity on all studied N2-dG adducts incorporating mainly incorrect dATP and dGTP and possibly utilizes a lesion «skipping» mechanism. PolDIP2 and RPA do not affect PrimPol activity on bulky N2-dG adducts in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} ions. PolDIP2 but not RPA significantly changes specificity of nucleotide incorporation by PrimPol on the undamaged template in the presence of Mn^{2+} increasing misincorporation of dATP and dTTP. Together, these findings establish that PolDIP2 and RPA can enhance bypass of non-bulky adducts by PrimPol but bulky N2-dG adducts PrimPol tolerate using the lesion «skipping» mechanism stimulated by Mn^{2+} ions.

**НОВАЯ ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ
БИОМАРКЕР РАКА ПЕЧЕНИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*****NOVEL LONG NON-CODING RNA AS A POTENTIAL BIOMARKER
OF LIVER AND PANCREAS CANCER**

О. Ю. Буренина¹, Н. Л. Лазаревич², Т. С. Зацепин^{1,3},
М. П. Рубцова^{1,3}, О. А. Донцова^{1,3}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Российский научный онкологический центр им. Н. Н. Блохина, Москва

³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

O. Y. Burenina¹, N. L. Lazarevich², T. S. Zatsepin^{1,3},
M. P. Rubtsova^{1,3}, O. A. Dontsova^{1,3}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

² N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow

E-mail: o.burenina@skoltech.ru

Аннотация

Рак печени и рак поджелудочной железы (РПЖ) — агрессивные онкологические заболевания, часто диагностируемые только на поздних стадиях ввиду отсутствия выраженных симптомов и специфических биомаркеров. Среди злокачественных заболеваний печени наиболее распространены гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) и холангиокарцинома (ХЦР), причем встречаются и смешанные опухоли ГЦК-ХЦР. В случае дистального расположения ХЦР ее не всегда можно однозначно дифференцировать от РПЖ. Таким образом, актуальной задачей исследования является поиск новых тканеспецифичных биомаркеров, ассоциированных с определенным видом рака. В настоящей работе мы впервые охарактеризовали новую длинную некодирующую РНК (днРНК) SNOL, ассоциированную с раком органов пищеварительной системы. Мы установили, что уровень экспрессии этой днРНК дифференциально изменяется в образцах ХЦР и ГЦК по сравнению с прилежащими тканями, что позволяет рассмотреть

© О. Ю. Буренина, Н. Л. Лазаревич, Т. С. Зацепин, М. П. Рубцова, О. А. Донцова, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 20-74-00141).

CHOL РНК в качестве потенциального диагностического и/или прогностическо-го онкомаркера.

Abstract

Liver cancer and pancreatic cancer (PC) are aggressive malignancies often diagnosed only in the late stages due to the lack of pronounced symptoms and specific biomarkers. Among liver cancers, the most common are hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA), whereas there are also mixed HCC-CCA tumors. In the case of distal location of CCA, it is not always possible to clearly differentiate it from the PC. Thus, a search for novel tissue-specific biomarkers associated with a particular type of cancer is a challenging task for a research. In this work, for the first time we characterized a novel long non-coding RNA (lncRNA) CHOL associated with cancers of the digestive system. We found that the expression level of this lncRNA varies differentially in CCA and HCC samples in comparison to adjacent tissues. This observation allows us to consider CHOL lncRNA as a potential diagnostic and/or prognostic oncomarker.

ДнРНК — обширный класс регуляторных молекул, часто ассоциированных с различными типами рака. На сегодняшний день известно несколько десятков днРНК, экспрессия которых изменяется при ХЦР и РПЖ, почти все из которых ассоциированы и с ГЦК. Ранее нами была описана новая печень-специфичная днРНК HELIS, характерная для ГЦК и отсутствующая в образцах ХЦР и РПЖ. В ходе поиска «комплементарной» днРНК, активно экспрессирующейся в РПЖ и ХЦР, мы обнаружили неохарактеризованный транскрипт, названный нами CHOL. Мы установили факт экспрессии CHOL РНК в раковых клетках печени и поджелудочной железы человека и определили ее преобладающую изоформу. Далее мы проанализировали уровень экспрессии CHOL РНК в парных (норма/рак) образцах общей РНК, выделенной из постоперационных тканей печени пациентов с диагнозом ХЦР и ГЦК. Было показано, что экспрессия CHOL РНК возрастает только в образцах ХЦР, тогда как при ГЦК уровень экспрессии этой днРНК существенно снижается по сравнению с прилежащими тканями печени. Полученные результаты позволяют предсказать высокий потенциал CHOL РНК как диагностического онкомаркера для дискриминации ХЦР и ГЦК.

**ГЕН MLIG-SKP1 НЕОБХОДИМ ДЛЯ ПРАВИЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ У РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО
СВОБОДНОЖИВУЩЕГО ЧЕРВЯ MACROSTOMUM LIGNANO**

**MLIG-SKP1 IS REQUIRED FOR CORRECT SPERM DEVELOPMENT
IN THE REGENERATIVE FREE-LIVING
FLATWORM MACROSTOMUM LIGNANO ***

В. Вавилова ¹, Е. Базарова ², М. Бирюков ¹,
К. Устьянцев ¹, Е. Березиков ¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

V. Vavilova ¹, E. Bazarova ², M. Biryukov ¹,
K. Ustyantsev ¹, E. Berezikov ¹

¹Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

E-mail: eberez@bionet.nsc.ru

Аннотация

В данном исследовании было проведено изучение влияния ультрафиолетового излучения типа С (УФ-С) и химического канцерогена метилметансульфоната на гомеостаз и транскрипционный профиль модельного плоского червя *Macrostomum lignano*, который является регенерирующим свободноживущим гермафродитом. Гены, ранее аннотированные в соматических стволовых клетках (необластах) и клетках-предшественниках, уровень экспрессии которых значительно усиливался при обработке УФ-С и метилметансульфонатом, были отобраны для последующего функционального анализа с помощью РНК-интерференции.

Abstract

In our study, we have been investigating effects of high-energy ultraviolet C (UVC) and a chemical carcinogen methyl methanesulfonate (MMS) on homeostasis and the transcriptional profile of the regenerative hermaphrodite free-living model flatworm *Macrostomum lignano*. Genes previously annotated as enriched in somatic stem cells (neoblasts) and progenitors and which were significantly upregulated upon the treatments,

© В. Вавилова, Е. Базарова, М. Бирюков, К. Устьянцев, Е. Березиков, 2020

* The work was supported by RFBR grant No 18-04-01011.

were selected for the subsequent functional analysis by RNA interference.

RNAi knockdown of one of the genes, a homolog of the human *skp1* (*S-Phase Kinase Associated Protein 1*) gave a prominent phenotype. SKP1 protein is an essential component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) ubiquitin ligase complex, which mediates the ubiquitination of proteins involved in cell cycle progression, signal transduction and transcription. We found that the RNAi-treated worms develop abnormally enlarged testes but otherwise appear normal. By subsequent DIC microscopy analysis, we identified that the observed morphology is due to incorrect morphology of spermatozoa that accumulate in testes. Sperm cells of the RNAi-treated worms lack characteristic features of normal spermatozoa, such as distal process (feeler) and elongated head, and have the shaft which resembles more the morphology of mid spermatid than that of the mature sperm. Additionally, the morphology of testes is changed, they have less sperm cells and appear empty. The reduced production of mature sperm is also confirmed by almost empty sperm vesicles compared to the control animals.

Thus, we can conclude an essential role of *Mlig-Skp1* gene for the correct development of mature sperm in *M. lignano*.

**РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ
СБОРКУ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ВИРУСА МАРБУРГ *****RECOMBINANT PLASMID PROVIDING ASSEMBLY
OF VIRUS-LIKE MARBURG VIRUS PARTICLES**

Н. В. Волкова, А. А. Исаева, О. С. Таранов,
Е. И. Казачинская, Д. Н. Щербаков

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

N. V. Volkova, A. A. Isaeva, O. S. Taranov,
E. I. Kazachinskaya, D. N. Shcherbakov

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: tasha_wolkowa11.93@mail.ru

Аннотация

Вирус Марбург (MARV) вызывает у людей и приматов лихорадку Марбург (Fever Marburg, FM) — заболевание, характеризующееся тяжелым течением, высоким уровнем контагиозности и летальности (от 30 до 90 %). Последние 30 лет не прекращаются исследования, направленные на разработку вакцины против вируса Марбург. Одной из перспективных платформ являются вакцины на основе вирусоподобных частиц. В работе была сконструирована рекомбинантная плаزمид, в составе которой содержатся гены белков NP и VP40, а также ген GP вируса Марбург. Было показано, что сконструированная плазмид при трансфекции культуры клеток HEK293T обеспечивает формирование вирусоподобных частиц.

Abstract

The Marburg virus (MARV) causes Marburg fever (Fever Marburg, FM) in humans and primates, a disease characterized by a severe course, a high level of contagiousness and mortality (from 30 to 90 %). For the last 30 years, work on a computer vaccine against the Marburg virus has not stopped. Vaccines based on virus-like particles are one of the promising models. In this work, a recombinant plasmid was constructed, in which the genes of the NP and VP40 proteins, as well as the GP gene of the Marburg virus, were established.

© Н. В. Волкова, А. А. Исаева, О. С. Таранов, Е. И. Казачинская, Д. Н. Щербаков, 2020

* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ № 18-04-00458.

It was shown that the constructed plasmid, upon transfection of the HEK293T cell culture, provides the formation of virus-like particles.

Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний США MARV занесен в категорию приоритетных патогенов, представляющих высокий риск для национальной безопасности и здравоохранения. Работа с вирусом Марбург сопряжена с высоким уровнем биобезопасности (BSL-4). В настоящее время ведутся работы по получению профилактических препаратов против лихорадки Марбург на основе ряда платформ. Одним из перспективных подходов в создании вакцин является платформа на основе вирусоподобных частиц. Подобные вакцины имеют пониженную реактогенность, а процесс их производства не требует больших затрат и соблюдения условий биобезопасности.

Поэтому целью данной работы стало получение рекомбинантной плазмиды, содержащей три основных белка вируса Марбург, способной вызывать формирование вирусоподобных частиц при трансфекции клеток млекопитающих.

Существует много работ по получению ВПЧ филовирюсов, однако наш подход отличается тем, что в работе по получению ВПЧ используется одна рекомбинантная плазида, одновременно содержащая гены трех целевых белков вируса Марбург.

Для получения плазмиды был проведен биоинформативный анализ генома MARV, синтез генов, кодирующих целевые белки VP40, NP и GP вируса Марбург, а также расчет специфических праймеров. Соответствующие гены были амплифицированы и клонированы в состав вектора pVAKS. Наличие встройки подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по методу Сэнгера.

Для получения вирусоподобных частиц была проведена трансфекция эукариотических клеток HEK293T полученной плазмидой с помощью липофектамина 3000. Микроскопические исследования показали формирование филоментоподобных структур спустя сутки после трансфекции культуры клеток.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ TIM-3 И PD-1 НА ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ Т-КЛЕТОК *IN VITRO* В НОРМЕ И ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

THE INFLUENCE OF TIM-3 AND PD-1 EXPRESSION ON THE CYTOKINE PRODUCTION BY T-CELLS *IN VITRO* IN NORM AND BRONCHIAL ASTHMA

В. А. Галдина¹, Е. А. Блинова²

¹Новосибирский государственный университет

²Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

V.A. Galdina¹, E. A. Blinova²

¹*Novosibirsk State University*

²*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk*

E-mail: vikagaldina@gmail.com

Аннотация

Работа посвящена изучению патогенетических механизмов, лежащих в основе аллергической бронхиальной астмы, в частности роли ингибиторных ко-рецепторов на Т-лимфоцитах. Поскольку эти рецепторы являются негативными регуляторами сигнала от Т-клеточного рецептора, они могут иметь существенное значение в развитии иммунного ответа, в том числе при аллергической астме.

Abstract

The study is focused on the investigation of pathogenic mechanisms, that is based in the pathogenesis of allergic bronchial asthma, in particular on the role of T-cell inhibitory receptors. Since these receptors are negative regulators of the signal from the T-cell receptor, they may contribute essentially to the development of the immune response, including response in allergic asthma.

Бронхиальная астма (БА) — это гетерогенное хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в патогенезе которого играют важную роль активированные Т-лимфоциты. В норме активация Т-клеток контро-

лируется сигналами через негативные регуляторы — PD-1 и Tim-3. Участие PD-1 и Tim-3 в патогенезе аллергических заболеваний изучено недостаточно, представленные в литературе данные противоречивы. Поэтому целью данного исследования было определение уровня экспрессии коингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 на Т-клетках и оценка их влияния на цитокин-продуцирующую активность Т-клеток при аллергической бронхиальной астме.

В исследование вошли 5 пациентов с аллергической БА (вне обострения) и 8 условно здоровых доноров. Выделенные из периферической крови МНК культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10 % FCS, с активаторами PMA и Ionomycin в 24-луночных планшетах в течение 20 часов. Выход цитокинов из клеток блокировали Brefeldin A. Клетки метили антителами против соответствующих антигенов (CD3, CD4, PD-1, Tim-3), затем проводили внутриклеточное окрашивание антителами против IL-4 и IFN γ . Клетки периферической крови окрашивали только антителами против поверхностных маркеров. Анализ проб проводили на цитометре FACS CantoII (BD, USA). Статистическую обработку данных проводили в программном обеспечении Statistica 6.0, используя непараметрические методы сравнения.

Пациенты с БА характеризовались сниженным числом CD8⁺ клеток, экспрессирующих только Tim-3 и одновременно Tim-3 и PD-1, в крови относительно показателей доноров. После культивирования по экспрессии Tim-3 и PD-1 Т-клетки доноров и пациентов не различались.

По продукции цитокинов достоверных отличий между группами доноров и пациентов с БА выявлено не было, но внутри групп были найдены значимые отличия между субпопуляциями клеток в зависимости от экспрессии Tim-3 и PD-1. Так, в группе доноров CD4⁺ клетки с фенотипами PD-1⁻Tim-3⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ больше продуцировали IL-4 (6,3 и 5,2 %, соответственно) относительно негативных по PD-1 и Tim-3 клеток (2,4 %). В группе пациентов с БА CD4⁺PD-1⁻Tim-3⁺ клетки вдвое больше продуцировали IL-4, чем CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺. Относительно продукции IFN γ в группе доноров CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺ и CD4⁺PD-1⁻Tim-3⁺ продуцировали больше IFN γ по сравнению с популяцией CD4⁺PD-1⁻Tim-3⁻ клеток. Аналогичная картина наблюдалась для CD8⁺ клеток. В группе пациентов только CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁻ и CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁻ показали значимые отличия в продукции IFN γ относительно негативной по PD-1 и субпопуляции. Таким образом, вне зависимости от наличия аллергопатологии в условиях стимуляции PMA/Ionomycin не наблюдалось снижение продукции

IL-4 и IFN γ T-клетками, экспрессирующими Tim-3 и PD-1, напротив, для отдельных популяций, позитивных по данным маркерам, наблюдалось усиление продукции. Возможно, для реализации негативной регуляции через PD-1 и Tim-3 T-клетке необходимо получить сигнал через T-клеточный рецептор.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ B-16 НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ *

EVALUATION OF THE EFFICACY OF MELANOMA B-16 COMBINED
THERAPY BASED ON DENDRITIC CELLS AND VACCINIA VIRUS

Т. А. Гамбург ¹, Е. П. Гончарова ², О. В. Марков ², М. А. Зенкова ²

¹*Novosibirsk State University*

²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

T. A. Gamburg ¹, E. P. Goncharova ², O. V. Markov ², M. A. Zenkova ²

¹*Novosibirsk State University*

²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: H.tanja5@mail.ru

Аннотация

В нашей работе мы показали, что ДК (дендритные клетки), праймированные лизатом инфицированных вирусом осповакцины LIVP/GFP опухолевых клеток меланомы B-16, эффективно активируют специфические цитотоксические Т-лимфоциты *in vitro*. Комбинированная терапия меланомы B-16 мышей на основе вируса осповакцины LIVP/GFP и дендритных клеток, активированных как опухолевыми, так и вирусными антигенами, увеличивает продолжительность жизни животных.

Abstract

In our work we showed that DC (dendritic cells) primed with a lysate of B-16 melanoma tumor cells, infected with vaccinia virus LIVP/GFP, effectively activate specific cytotoxic T-lymphocytes *in vitro*. Combination therapy of B-16 melanoma based on vaccinia virus LIVP/GFP and dendritic cells, activated by both tumor and viral antigens, increases the lifespan of animals.

Терапия опухолевых заболеваний с помощью дендритно-клеточных вакцин является одним из наиболее перспективных направлений современной медицины. В настоящее время для получения функционально активных ДК

© Т. А. Гамбург, Е. П. Гончарова, О. В. Марков, М. А. Зенкова, 2020

* Исследование было поддержано грантом РФФИ № 18-34-20109.

используют опухолевые антигены. В нашем исследовании мы проводили активацию ДК как опухолевыми, так и вирусными антигенами. Исследования проводили на модели вирус осповакцины LIVP/GFP / меланома В-16.

Степень активации ДК оценивали по уровню экспрессии маркеров созревания с использованием метода проточной цитофлуорометрии. Результаты экспериментов показали, что уровень экспрессии маркеров созревания CD80, CD86 и CCR7 не меняется при выбранных способах активации ДК. Однако анализ цитотоксической активности спленоцитов при использовании различных комбинаций вирусных и опухолевых антигенов для созревания ДК показал, что максимальной цитотоксической активностью против инфицированных вирусом клеток меланомы В-16 *in vitro* обладают цитотоксические Т-лимфоциты, активированные ДК, для созревания которых был использован лизат инфицированных опухолевых клеток (рис. 1).

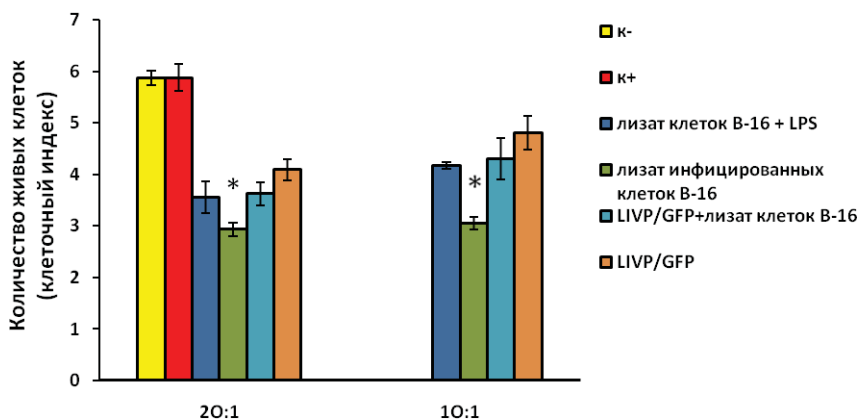


Рис. 1. Результаты анализа цитотоксического действия цитотоксических Т-лимфоцитов на клетки В-16, инфицированные вирусом LIVP/GFP. Стандартное отклонение рассчитано на основании значений клеточного индекса, посчитанного для 3 проб, $p < 0,05$

В экспериментах *in vivo* наблюдалась тенденция увеличения выживаемости животных, получавших комбинированную терапию, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,07$, рис. 2).

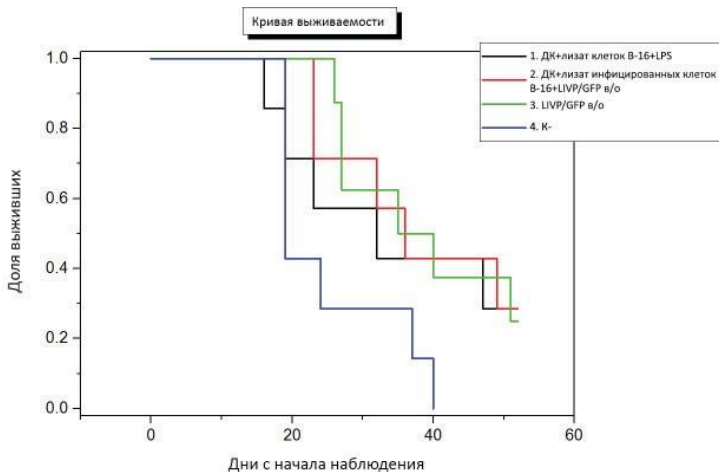


Рис. 2. Кривые выживаемости мышей в зависимости от способа терапии меланомы В-16

Таким образом, можно сделать вывод, что комбинированная терапия с использованием вируса осповакцины LIVP/GFP и ДК, активированных лизатом инфицированных опухолевых клеток меланомы В16, вызывает активацию опухоль-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов и приводит к увеличению продолжительности жизни животных.

**ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНОВ *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*,
TUBB3, *TYMS*, *GSTP1* И *BRCA1* У ПАЦИЕНТОВ
С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО***

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MRNA EXPRESSION
OF *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1*
AND *BRCA1* GENES IN PATIENTS
WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

К. А. Гаптулбарова, М. М. Цыганов, Е. О. Родионов,
М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, Н. В. Литвяков

*Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН*

K. A. Gaptulbarova, M. M. Tsyganov, Ye. O. Rodionov,
M. K. Ibragimova, D. S. Dolgasheva, N. V. Litvyakov

*Research Institute of Oncology,
Tomsk National Research Medical Center of the RAS*

e-mail: Xenia.gaptilbarova@yandex.ru

Аннотация

Сегодня для лечения больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) используют химиотерапию. Сейчас основной прогресс в лекарственном лечении рака легкого связывают с использованием таргетных препаратов. Одним из подходов к персонализации назначения схемы химиотерапии при НМРЛ является оценка экспрессии генов химиочувствительности (*BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* и др.), которые определяют чувствительность опухолевых клеток к отдельным химиопрепаратам в зависимости от уровня экспрессии.

Abstract

Today, chemotherapy is used to treat patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Currently, the main progress in drug treatment of lung cancer is associated with the use of targeted drugs. One of the approaches to personalizing the prescription of a chemotherapy

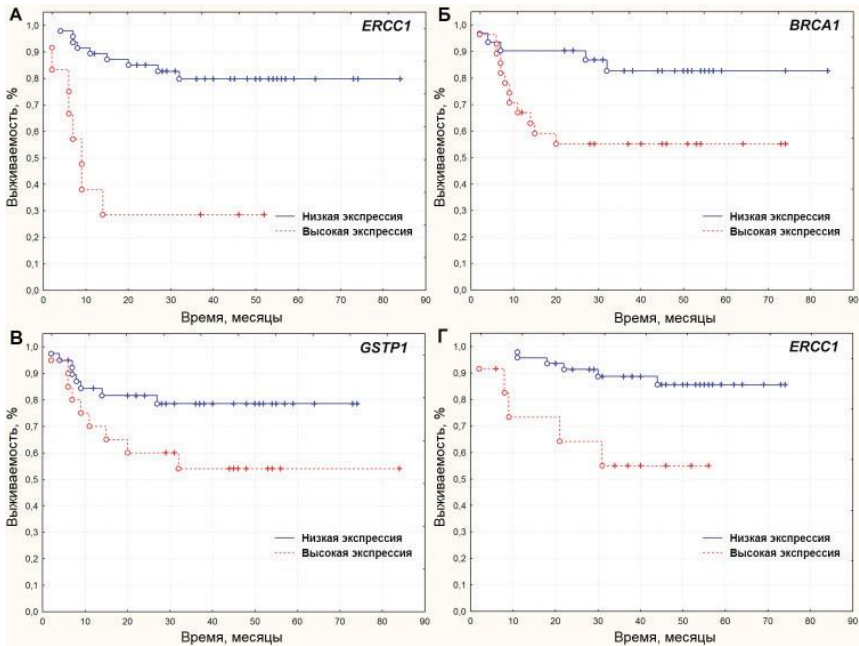
© К. А. Гаптулбарова, М. М. Цыганов, Е. О. Родионов, М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, Н. В. Литвяков, 2020

* Работа поддержана грантом РФФИ 20-015-00023 А.

regimen for NSCLC is to assess the expression of genes for chemotherapy (*BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1*, etc.), which determine the sensitivity of tumor cells to certain chemotherapy drugs depending on the expression level.

Материал и методы

В исследование были включены 59 больных НМРЛ IIВ–IIIА стадии. В качестве материала были использованы операционные образцы опухолевой и нормальной тканей, из которых выделяли РНК с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии восьми генов химиочувствительности *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). Статистические расчеты проводились с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).



Кривые безметастатической (А, Б, В) и общей выживаемости (Г) больных в зависимости от уровня экспрессии *ERCC1*; *BRCA1*; *GSTP1*

Результаты

С использованием метода Каплана — Мейера было показано, что при низкой экспрессии (менее 1) генов *ERCC1*, *BRCA1* и *GSTP1* (log-rank test $p = 0,0004$, $0,01$, $0,01$) наблюдаются более высокие показатели безметастатической выживаемости по сравнению с группой пациентов с высоким уровнем экспрессии (более 1) этих генов.

У пациентов с уровнем экспрессии *ERCC1* < 1 показатели 4-летней выживаемости составляют 80 % в сравнении с 29 % другой группы (log-rank test $p = 0,0004$), то же установлено для гена *BRCA1* (см. рисунок, А и Б). Показатели безметастатической выживаемости больных с высоким уровнем экспрессии исследуемого гена статистически значимо ниже, 55 против 83 % (при log-rank test $p = 0,01$).

Анализ общей выживаемости позволил установить, что наибольшие показатели были достигнуты у пациентов с гипоэкспрессией гена *ERCC1*, 86 против 55 % (log-rank test $p = 0,002$).

Заключение. Таким образом, комплексная оценка экспрессии генов химочувствительности важна не только с точки зрения понимания неоднородности сложности в области молекулярной биологии НМРЛ, но и для более точного прогноза течения заболевания.

**МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ЯМР
В ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ МЫШЕЙ ЛИНИИ SCID ***

**METABOLIC ANALYSIS OF HUMAN MALIGNANT TUMOR TISSUES
BY NMR IN AN ANIMAL MODEL OF SCID MICE**

А. В. Глинских^{1,2}, О. А. Снытникова¹, И. А. Разумов²,
И. В. Коптюг¹, Ю. П. Центалович¹, А. Е. Акулов²

¹Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

A. V. Glinskikh^{1,2}, O. A. Snytnikova¹, I. A. Razumov²,
I. V. Koptuyug¹, Yu. P. Tsentalovich¹, A. E. Akulov²

¹International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk
Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск

²Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

E-mail: glinskikhav@gmail.com

Аннотация

Применение метаболомного анализа для изучения злокачественных опухолей человека представляет большой интерес для области трансляционной медицины. В данной работе метод ЯМР применяется для исследования глиобластомы человека U87 и гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 в модели мышей линии SCID.

Abstract

Implementation of metabolomic analysis for the study of human malignant tumors exhibits great interest for the field of translational medicine. In this work, NMR method is used to study human glioblastoma U87 and human hepatocellular carcinoma HepG2 in a SCID mouse model.

© А. В. Глинских, О. А. Снытникова, И. А. Разумов, И. В. Коптюг, Ю. П. Центалович, А. Е. Акулов, 2020

* Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 17-54-33037 и № 18-33-20097.

Метаболомный подход находит широкое применение в изучении злокачественных опухолей, поскольку позволяет с высокой точностью определять молекулярные механизмы патологий и выявлять их потенциальные биомаркеры. Важными инструментами в подобных исследованиях являются животные модели опухолей человека. Одним из наиболее широко применяемых в метаболомике аналитических методов является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), сочетающая высокую эффективность анализа метаболомных профилей и простоту экспериментальных процедур.

В данной работе метод ЯМР метаболомного анализа применяется для исследования глиобластомы человека U87 и гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Для моделирования данных опухолей человека были выбраны мыши линии SCID. Ксенотрансплантация клеток HepG2 лабораторным животным проводилась подкожно, а клеток U87 как подкожно, так и ортотопически (в левое полушарие мозга). У мышей с U87 были взяты образцы ткани головного мозга, подкожной опухоли и крови, а у мышей с HepG2 образцы ткани печени, подкожной опухоли и крови.

В результате ЯМР-исследования были количественно определены концентрации более 45 метаболитов для образцов ткани мозга, печени, подкожных опухолей и более 35 — для сыворотки крови. Сравнительный анализ концентраций метаболитов тканей групп контроль/опухоль проводился с помощью t-теста Стьюдента. В ипсилатеральных областях головного мозга в норме и при развитии U87 достоверные отличия были найдены по 23 метаболитам, в контралатеральных — по 12. Сравнение метаболомных профилей ткани мозга при ксенотрансплантации глиобластомы и ткани подкожной U87 выявило значимое влияние места локализации опухолевых клеток (найдено 43 отличия). Результаты метаболомного профилирования сыворотки крови контрольной группы и группы с U87 достоверно отличаются по 10 метаболитам. Анализ метаболомных профилей печени в контроле и при развитии подкожной HepG2, а также сыворотки крови этих же групп показал достоверные отличия в концентрациях 15 и 17 метаболитов соответственно. При сравнении ткани печени группы HepG2 и ткани подкожной опухоли было выявлено 40 метаболитов отличия. Данное исследование предоставляет новые знания о метаболизме тканей мышей при развитии злокачественных опухолей человека и демонстрирует эффективность метода ЯМР в метаболомике.

**РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ЦИКЛА КРЕБСА В ФОРМИРОВАНИИ
УСТОЙЧИВОСТИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
К ДЕЙСТВИЮ СТРЕСС-ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ
(СТРЕССУ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ,
ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ, ТЕПЛОВОМУ ШОКУ) ***

THE ROLE OF KREBS CYCLE METABOLITES IN FORMATION
OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* RESISTANCE TO DIFFERENT
STRESSES (ENDOPLASMIC RETICULUM, OXIDATIVE, HEAT SHOCK)

Д. А. Голубев, Д. В. Яковлева, Л. А. Коваль, А. А. Москалёв

Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар

D. A. Golubev, D. V. Yakovleva, L. A. Koval, A. A. Moskalev

Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch RAS, Syktyokar

E-mail: denismeatboy@gmail.com

Аннотация

В работе изучали влияние альфакетоглутаровой, янтарной, фумаровой, лимонной, яблочной кислоты на возрастную устойчивость *Drosophila melanogaster* к окислительному стрессу, гипертермии и стрессу эндоплазматической сети. Было обнаружено, что метаболиты цикла Кребса оказывают разнонаправленный эффект на параметры выживаемости особей *Drosophila melanogaster* в условиях стресса.

Abstract

In this paper we studied the effect of alpha-Ketoglutaric, succinic, fumaric, citric, and malic acids on the age-related resistance of *Drosophila melanogaster* to oxidative stress, hyperthermia and endoplasmic reticulum stress. It was shown that metabolites of the Krebs cycle have a multidirectional effect on the parameters of survival of *Drosophila melanogaster* under stress conditions.

© Д. А. Голубев, Д. В. Яковлева, Л. А. Коваль, А. А. Москалёв, 2020

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-00043 «Исследование геропротекторных свойств метаболитов цикла Кребса на модели *Drosophila melanogaster*».

Цикл Кребса — это ключевой этап дыхания всех клеток, использующих кислород, центр пересечения множества метаболических путей в организме. Универсальность данного биохимического процесса и низкая токсичность его метаболитов позволяет рассматривать их в качестве мишеней для разработки фармакологических препаратов, способствующих снижению скорости старения без ухудшения возрастзависимых показателей.

В данной работе изучали влияние альфакетоглутаровой, янтарной, фумаровой, лимонной, яблочной кислот в концентрациях 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ и 1 мМ на продолжительность жизни самцов и самок *Drosophila melanogaster*. Прием метаболитов цикла Кребса оказал разнонаправленный эффект на параметры выживаемости в условиях действия индуктора свободных радикалов параквата.

Для анализа устойчивости к действию окислительного стресса использовали раствор 20 мМ параквата (Methyl Viologen, Sigma). В качестве теплового шока использовали 35-градусную гипертермию. Стресс эндоплазматической сети индуцировали раствором 12 мкМ туникамицина (Sigma Aldrich, США). Сбор данных осуществляли с помощью аппаратно-программного комплекса DAM *Drosophila* Locomotor Activity Monitor (TriKinetics, USA). По полученным данным рассчитывали перцентили (25, 50, 75, 90) выживаемости и строили кривые дожития. Для оценки статистической значимости использовали точный критерий Фишера.

Было показано, что метаболиты цикла Кребса разнонаправлено влияют на параметры выживаемости особей *Drosophila melanogaster* в условиях окислительного стресса, теплового шока и стресса эндоплазматической сети.

ПЕПТИДЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С МОЛЕКУЛОЙ АНТИГЕНА-4 ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ (CTLA-4)*

PEPTIDES INTERACTING WITH THE HUMAN CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE (CTLA-4) ANTIGEN-4 MOLECULE

А. А. Гордеева¹, С. В. Подлесных¹, А. И. Шаповал^{1,2}

¹ Алтайский государственный университет,
Российско-американский противораковый центр, Барнаул, Россия

² Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна,
Университет штата Аризона, Темпи, США

A. A. Gordeeva¹, S. V. Podlesnykh¹, A. I. Chapoval^{1,2}

¹ Altai State University, Russian-American Anti-Cancer Center, Barnaul, Russia

² Center for Innovation in Medicine, Biodesign Institute,
Arizona State University, Tempe, USA

E-mail: anastasia.17.98@mail.ru

Аннотация

Обсуждается применение пептидов как альтернативы моноклональным антителам к рецептору CTLA-4 для иммунотерапии онкологических заболеваний.

Abstract

Peptides are discussed as alternatives to monoclonal antibodies to the CTLA-4 receptor for immunotherapy of oncological diseases.

Рецепторы лигандов семейства В7, локализованные на мембране Т-лимфоцитов, могут подавать сигналы и тем самым усиливать или снижать иммунный ответ. Взаимодействие рецептора CTLA-4 с лигандами В7-1 (CD80) или В7-2 (CD86) приводит к супрессии иммунитета [1].

Целью работы было выявление и изучение иммунохимических свойств пептидов, взаимодействующих с CTLA-4.

© А. А. Гордеева, С. В. Подлесных, А. И. Шаповал, 2020

* Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ FZMW-2020-0007) и РФФИ (№ 17-54-33003 и № 19-44-220008).

Для выявления пептидов, специфически связывающихся с CTLA-4, использовали *пептидные микрочипы*, содержащие 330034 пептидов со случайными аминокислотными последовательностями. Рекombинантный химерный белок CTLA-4Fc, содержащий Fc-фрагмент IgG1 человека, наносили на микрочипы. Взаимодействие CTLA-4Fc с пептидами на микрочипе определяли с помощью флуоресцентных вторичных антител против иммуноглобулина человека. Для подтверждения специфичности взаимодействия отобранных пептидов с CTLA-4 использовался *метод иммуноферментного анализа* (ИФА).

Нами были выявлены 19 пептидов, расположенных на микрочипе, которые связываются CTLA-4Fc, но не связываются с другими рекombинантными белками [2]. Для дальнейших экспериментов были синтезированы 8 пептидов. Один из синтезированных пептидов, под порядковым номером р345, показал максимальное взаимодействие с CTLA-4Fc, которое определялось по увеличению оптической плотности в ИФА относительно показателей контрольного пептида р333. Более того пептид р345 снижал на 45 % взаимодействие CTLA-4 рецептора с В7-1 лигандом.

Таким образом, пептид р345 можно рассматривать как перспективную молекулу при разработке иммуностимулирующего препарата, блокирующего взаимодействие В7-1 и В7-2 лигандов с рецептором CTLA-4, ингибирующего иммунный ответ. Пептид р345 может стать альтернативой моноклональным антителам против CTLA-4 (таким, как ипилимуиаб и тремелидумаб), которые используются в настоящее время при иммунотерапии онкологических заболеваний.

Литература

1. Шаповал А. И., Шаповал С. П., Щербакова Н. С., Щербаков Д. Н. Молекулы контроля иммунитета семейства В7. Ч. 1. Общая характеристика и первые представители: В7-1, В7-2, В7-Н1, В7-Н2 И В7-DC // Биоорганическая химия. 2019. Т. 45. № 4. С. 225–240.
2. Подлесных С. В., Шаньшин Д. В., Колосова Е. А., Мурашкин Д. Е., Шапова О. Н., Щербаков Д. Н., Шаповал А. И. Разработка стратегии поиска пептидных блокаторов белков в составе молекулярных точек контроля иммунного ответа // Биоорганическая химия. 2018. Т. 44. № 2. С. 138–145.

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОТЕИНОВ И ЦИТОКИНОВ С ВЛИЯНИЕМ
HUMAN LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR
НА КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**RELATIONSHIP BETWEEN PROTEINS, CYTOKINES AND INFLUENCE
OF HUMAN LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR ON CELLS
OF BREAST CANCER**

К. И. Давлетова, А. В. Бернадо, А. А. Студеникина

*Новосибирский государственный медицинский университет
Научно-исследовательский институт молекулярной биологии
и биофизики — структурное подразделение
ФГБНУ ФИЦ ФТМ, Новосибирск*

K. I. Davletova, A. V. Bernado, A. A. Studenikina

*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk,
Institute of Molecular Biology and Biophysics —
subdivision of FRC FTM, Novosibirsk*

E-mail: christina.davletova@gmail.com

Аннотация

Исследовали спонтанную и HLDF-индуцированную продукцию протеинов и цитокинов клетками опухоли и крови у больных раком молочной железы с различной реакцией на дифференцирующую активность HLDF. В результате исследования установлено, что спонтанная продукция ER α и PGR клетками опухоли, а также HLDF-индуцированная продукция IL-10 клетками опухоли и HLDF-индуцированная продукция IFN- γ , VEGF и MCP-1 клетками крови различаются у больных раком молочной железы с различной реакцией на HLDF.

Abstract

The paper focuses on spontaneous and induced by HLDF production of cytokines and proteins by cancer and blood cells in patients with breast cancer with different reaction on differentiating activity of HLDF. The paper concludes that spontaneous production of ER α and PGR by cancer cells as well as HLDF-induced production of IL-10 by cancer cells and IFN- γ , VEGF and MCP-1 by blood cells differ in patients with breast cancer with different reaction on HLDF.

Предпосылки. Ранее нами было показано, что Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF) влияет на снижение относительного содержания низкодифференцированных клеток и на увеличение относительного содержания высокодифференцированных клеток инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы (ИКНТ МЖ) *in vitro*. Отсутствие цитотоксических эффектов, наряду с дифференцирующей активностью HLDF позволяет рассматривать данный фактор в качестве кандидата для применения в дифференцировочной терапии рака молочной железы. Целью настоящего исследования явилось изучение продукции протеинов и цитокинов клетками опухоли и клетками крови у больных ИКНТ МЖ с наличием и отсутствием реакции на HLDF.

Материал исследования — биоптат опухоли и периферическая кровь 36 больных ИКНТ МЖ. Для определения спонтанной и HLDF-индуцированной продукции цитокинов клетками опухоли и крови одну часть образцов инкубировали в питательной среде DMEM-F12, а другую при тех же условиях с HLDF в концентрации 2 мкг/мл, после чего клетки осаждали и получали супернатант. В супернатанте с помощью ИФА определяли концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест» и протеинов HRG, PAI-1, CDH1, ER α , PGR с использованием наборов производства Cloud-Clone Corp. (США). Статистическую обработку выполняли с использованием SPSS Statistics 22.

В результате проведенного исследования были установлены различия в продукции протеинов и цитокинов в зависимости от влияния HLDF на дифференцировку клеток ИКНТ МЖ *in vitro*. Спонтанная продукция ER α клетками опухоли была выше у больных с реакцией HLDF, а спонтанная продукция PGR — у больных без реакции на HLDF. У больных ИКНТ МЖ с реакцией злокачественных клеток на дифференцирующую активность HLDF, HLDF-индуцированная продукция IL-10 клетками опухоли была ниже, чем у больных ИКНТ МЖ без реакции на HLDF. Что касается продукции протеинов и цитокинов клетками крови, то HLDF-индуцированная продукция IFN- γ , VEGF и MCP-1 также была ниже у больных ИКНТ МЖ с реакцией HLDF, по сравнению с больными без реакции на HLDF.

Не исключено, что оценка спонтанной продукции ER α и PGR клетками опухоли, а также HLDF-индуцированной продукции IL-10 клетками опухоли и HLDF-индуцированной продукции IFN- γ , VEGF и MCP-1 клетками крови в совокупности могут составить критерии, отражающие эффективность применения HLDF у больных ИКНТ МЖ.

**НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИЕ
ЛИПОФИЛЬНЫЕ N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫЕ ГРУППЫ:
ПОЛУЧЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ***

**NOVEL OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING LIPOPHILIC
N-(SULFONYL)-PHOSPHORAMIDATE GROUPS: SYNTHESIS
AND BIOLOGICAL PROPERTIES**

А. С. Держалова^{1,2}, О. В. Марков¹, А. А. Фокина^{2,3}, Ю. Шиохама⁴,
Т. С. Зацепин^{5,6}, М. Фуджи⁷, М. А. Зенкова¹, Д. А. Стеценко^{2,3}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

⁴ *Университет Рюкю, Окинава, Япония*

⁵ *Сколковский институт науки и технологий,
Инновационный центр «Сколково»*

⁶ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

⁷ *Университет Киндай, Иизука, Фукуока, Япония*

A. S. Derzhalova^{1,2}, O. V. Markov¹, A. A. Fokina^{2,3}, Yu. Shiohama⁴,
T. S. Zatsepin^{5,6}, M. Fuji⁷, M. A. Zenkova¹, D. A. Stetsenko^{2,3}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
SB RAS, Novosibirsk*

² *Novosibirsk State University*

³ *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

⁴ *University of the Ryukyus, Okinawa, Japan*

⁵ *Skolkovo Institute of Science and Technology, Innovation Centre Skolkovo*

⁶ *Lomonosov Moscow State University*

⁷ *Kindai University, Iizuka, Fukuoka, Japan*

E-mail: alina.derzhalova@gmail.com

© А. С. Держалова, О. В. Марков, А. А. Фокина, Я. Шиохама, Т. С. Зацепин,
М. Фуджи, М. А. Зенкова, Д. А. Стеценко, 2020

* This work was supported by RSF grant № 19-74-30011 (cytotoxicity, confocal microscopy, flow cytometry, dynamic light scattering), RFBR grant № 18-515-57006 (oligonucleotide synthesis), and JMRF grant No. 2018JP002 (biological activity).

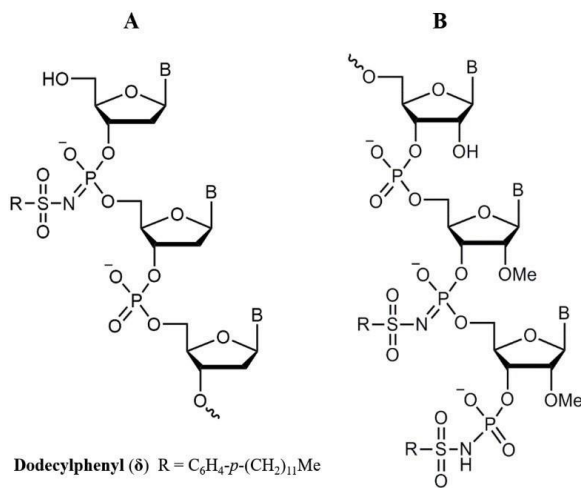
Аннотация

Впервые синтезированы и охарактеризованы производные ДНК и РНК, включающие от одной до четырех липофильных додецилфенильных или гексадецильных групп в межнуклеотидных положениях вблизи 3'- или 5'-конца. Была исследована цитотоксичность модифицированных олигодезоксинуклеотидов и их способность проникать в клетки без трансфекционного агента. Липофильные siРНК, нацеленные на подавление экспрессии гликопротеина RGMa, проявляют ингибиторную активность в культуре клеток.

Abstract

New DNA and RNA derivatives incorporating one to four lipophilic dodecylphenyl or hexadecyl groups at internucleotidic positions near the 3' or 5'-end were synthesized and characterized. Modified oligodeoxynucleotides were checked for cytotoxicity and ability to enter cells without transfection agents. Lipophilic siRNAs targeting repulsive guidance molecule a (RGMa) have shown a notable gene silencing activity in cell culture.

Widespread application of therapeutic oligonucleotides is hampered by their inefficient cellular uptake and poor bioavailability. Conjugates of antisense oligonucleotides and small interfering RNAs with neutral lipids have improved transfection ability and extended half-life in the blood stream with beneficial impact on therapeutic activity *in vivo* [1].



Structures of lipophilic *N*-(sulfonyl)-phosphoramidate derivatives of DNA (A) and RNA (B)

New DNA and RNA derivatives are described, which incorporate one to four lipophilic *N*-(sulfonyl)-phosphoramidate groups, *viz.*, dodecylphenyl or hexadecyl groups at internucleotidic positions near the 3'- or 5'-end (Figure). The oligonucleotides were obtained by automated solid-phase synthesis using Staudinger reaction with the corresponding sulfonyl azide to introduce the modifications, and characterized by RP-HPLC, PAGE and MALDI-TOF MS as described before [2].

Oligodeoxynucleotides containing one or two lipophilic groups next to the 5'-end were not cytotoxic up to 20 μ M for human RAW 264.7 or M ϕ cells, and were taken up by the cells much more efficiently than the unmodified counterpart. As shown by confocal microscopy, the oligonucleotides localized in the cytosol mainly in endosomes. Quantities of internalized oligonucleotide depended on the type of modification and the cell line. Oligonucleotides with hexadecyl groups were taken up better than the same with dodecylphenyl groups, and the ones carrying two lipophilic groups penetrated into cells more efficiently than those containing only one group.

Modified siRNAs containing two lipophilic groups next to the 3'-end of the passenger strand or four groups at the 3'-ends of both strands were also obtained. A known sequence targeting repulsive guidance molecule a (RGMa) was used [3]. The siRNAs with two groups showed similar gene silencing activity in PK-59 cells as unmodified anti-RGMa siRNA, whereas siRNAs containing four modifications in both strands were less active. The siRNA with two hexadecyl groups was the best silencer.

References

1. De Smidt P. C., Le Doan T., de Falco S., van Berkel T. J. Association of antisense oligonucleotides with lipoproteins prolongs the plasma half-life and modifies the tissue distribution. // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19. P. 4695–4700.
2. Burakova E. A., Derzhalova A. S., Chelobanov B. P., Fokina A. A., Stetsenko D. A. New Oligodeoxynucleotide Derivatives Containing *N*-(Sulfonyl)-Phosphoramidate Groups. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. № 6. P. 662–668.
3. Kitayama M., Ueno M., Itakura T., Yamashita T. Activated microglia inhibit axonal growth through RGMa. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 9. e25234.

**БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗ САЛПЫ *THALIA DEMOCRATICA******BIOCHEMICAL PROPERTIES OF NOVEL PHOTOACTIVATABLE
FLUORESCENT PROTEINS FROM THE SALP *THALIA DEMOCRATICA***

М. А. Добронос^{1,2}, Т. В. Чепурных¹, Н. Н. Случанко³,
А. Ю. Гороховатский¹, И. В. Ямпольский¹

¹Институт биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

²Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

³Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

M. A. Dobronos^{1,2}, T. V. Chepurnykh¹,
N. N. Sluchanko³, A. Yu. Gorokhovatsky¹, I. V. Yampolsky¹

¹*Shemyakin — Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry SB RAS, Moscow*

²*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

³*Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow*

E-mail: m.dobronos@mail.ru

Аннотация

Клонированы новые флуоресцентные белки из морской салпы *Thalia democratica* (ThFP1 и ThFP2). Показана их способность к фотоактивации, описаны некоторые биохимические свойства.

Abstract

Two novel fluorescent proteins (ThFP1 and ThFP2) were cloned from the marine salp *Thalia democratica*. Here we describe photoactivation and some biochemical properties of ThFP1 and ThFP2.

© М. А. Добронос, Т. В. Чепурных, Н. Н. Случанко, А. Ю. Гороховатский, И. В. Ямпольский, 2020

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2605.2020.4

Фотоактивируемые флуоресцентные белки (PAFPs) показывают уникальную способность изменять свои спектральные характеристики под действием интенсивного света определенной длины волны. Некоторые из таких белков после облучения становятся ярче, другие при фотоактивации изменяют спектр флуоресценции. Найденные нами при анализе транскриптома сальпы *Thalia democratica* флуоресцентные белки (названные ThFP1 и ThFP2) были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli*, после чего очищены с помощью металл-аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Белки ThFP1 и ThFP2 показывают свойства фотоактивации при облучении 365 и 445 нм. Оба этих белка способны к многократному фотопереключению, показывая очень похожий барьер энергии активации E_a (22,36 и 23,97 ккал/моль для ThFP1 и ThFP2 соответственно). Несмотря на близкие значения E_a , скорость релаксации ThFP1 немного (~1,2–1,5 раза) меньше при исследованных температурах (3–35 °C), чем у ThFP2. Результаты гель-фильтрации указывают на то, что олигомерный статус белков зависит от их концентрации, кроме того ThFP2 показывает склонность к мономеризации при фотоактивации. Было обнаружено, что кинетика фотоактивации ThFP1 является монофазной, тогда как фотоактивация ThFP2 — многоэтапный процесс. Способность к фотоактивации этих белков сохраняется при экспрессии в клетках млекопитающих.

АНАЛИЗ АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНА *PARP1* В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *

ANALYSIS OF DNA COPY NUMBER ABERRATIONS *PARP1* GENE IN BREAST TUMOR

Д. С. Долгашева, М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов

*Научно-исследовательский институт онкологии
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН*

D. S. Dolgasheva, M. K. Ibragimova, M. M. Tsyganov

Cancer Research Institute Tomsk National Research Medical Center RAS

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Аннотация

Поли (АДФ-рибоза) полимераза играет важную роль в восстановлении одноцепочечных и двухцепочечных разрывов ДНК. Как известно, активация гена *PARP1* является альтернативным путем репарации ДНК в опухолевых клетках. В связи с этим нарушения в данном гене могут быть связаны с эффективностью лечения больных раком молочной железы (РМЖ). Таким образом, целью исследования явилось изучение связи aberrаций числа копий гена *PARP1* при раке молочной железы с эффективностью и прогнозом заболевания.

Abstract

Poly (adp-ribose) polymerase plays an important role in the repair of single-strand breaks (SSB) and double-strand breaks (DSB). As is known, *PARP1* gene activation is an alternative way of DNA repair in tumor cells. In this regard, violations in this gene may be associated with the effectiveness of treatment of breast cancer patients. Thus, the aim of the study was to study the relationship between the copy number aberrations of the *PARP1* gene in breast cancer with the efficacy and prognosis of disease.

Материалы и методы

В исследование включены 85 больных люминальным В РМЖ IIА–IIIВ стадии с морфологически верифицированным диагнозом. ДНК выделяли из биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA

© Д. С. Долгашева, М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов, 2020

* Работа поддержана грантом РФФ № 19-75-00027.

mini Kit (Qiagen, Germany). Целостность и чистоту ДНК оценивали методом капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Для оценки CNA проводили микроматричный анализ на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности (Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Результаты

В 50,9 % случаев (58/114) наблюдалась амплификация *PARP1*; делеция обнаружена в 31,6 % случаев (36/114); нормальное состояние гена наблюдалось у 20 пациентов (17,5 %). Далее мы оценили связь исследуемых параметров с эффектом неoadъювантной химиотерапии (НХТ) (рис. 1). Оказалось, что частота амплификаций в группе больных с объективным ответом статистически значимо выше по сравнению с группой пациентов со стабилизацией и прогрессированием (55,8 %, 43/77 случаев против 40,5 %, 15/37 случаев, $p = 0,004$).

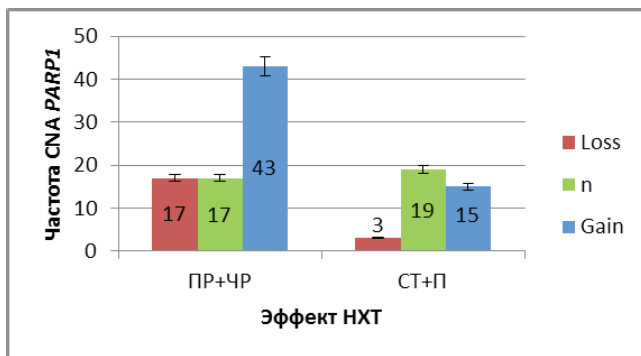


Рис. 1. Связь CNA гена *PARP1* в опухоли молочной железы с эффектом неoadъювантной химиотерапии. *PP* — полная регрессия, *CP* — частичная регрессия, *CT* — стабилизация, *П* — прогрессирование

Далее с использованием метода Каплана — Майера были оценены показатели общей и безметастатической выживаемости больных РМЖ в зависимости от наличия хромосомных aberrаций исследуемого гена (рис. 2). Несмотря на то что наличие амплификации определяло хороший ответ на проводимую химиотерапию, показатели безметастатической выживаемо-

сти таких больных были значительно ниже, чем у пациентов с делецией или нормальным состоянием гена (\log -rank test $p = 0,006$), (рис. 2, А).

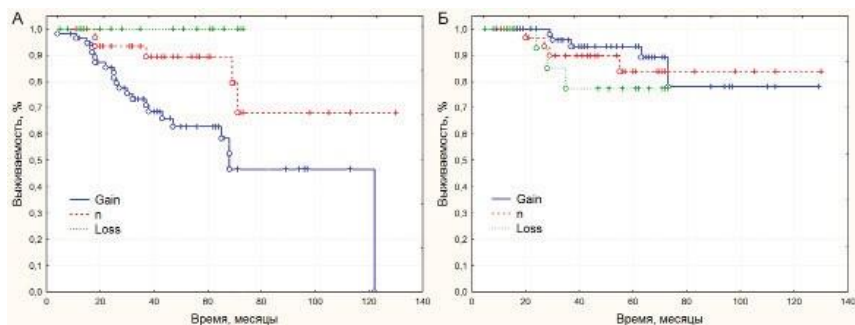


Рис. 2. Безметастатическая (А) и общая (Б) выживаемость больных раком молочной железы в зависимости от CNA гена *PARP1*

Так, пациенты с делецией имели 100 % безметастатическую выживаемость. Статистически значимых различий в показателях общей выживаемости у исследуемых пациентов установлено не было (\log -rank test $p = 0,273$) (рис. 2, Б).

Заклучение

Таким образом, было показано, что наличие амплификации гена *PARP1* сопряжено с хорошим ответом на НХТ. При этом амплификация *PARP1* связана с плохим прогнозом заболевания. Важно отметить, что данный показатель в опухоли молочной железы регистрируется более чем у половины больных, что делает его хорошим прогностическим маркером. Однако данный вопрос требует дальнейшего исследования, в том числе и на других молекулярных подтипах рака молочной железы.

**TGF- β 1 И ЕГО МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ:
СВЯЗЬ С ОСОБЕННОСТЯМИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ЭСТРОГЕН-ПОЗИТИВНЫМ РАКОМ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ***

**TGF- β 1 AND ITS MEMBRANE RECEPTORS: RELATIONSHIP
WITH THE CLINICAL COURSE IN ESTROGEN-POSITIVE
BREAST CANCER PATIENTS**

Т. А. Дронова^{1,2}, Н. Н. Бабышкина^{1,2,3}, С. В. Паталяк¹,
С. В. Вторьшин^{1,3}, Е. М. Стонимская⁴, Н. В. Чердынцева^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального
исследовательского медицинского центра Российской академии наук

² Томский государственный университет

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет

T. A. Dronova^{1,2}, N. N. Babyshkina^{1,2,3}, S. V. Patalyak¹,
S. V. Vtoryshin^{1,3}, E. M. Slonimskaya⁴, N. V. Cherdyntseva^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center

² National Research Tomsk State University

³ Siberian State Medical University, Tomsk

⁴ St. Petersburg State University

E-mail: tanyadronova@mail.ru

Аннотация

Поиск молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с клиническими характеристиками течения рака молочной железы (РМЖ) остается одним из приоритетных направлений фундаментальных исследований. Целью работы явилась оценка SNPs генов *TGF- β 1*, *TGF- β R1*, *TGF- β R2*, а также их белковой и геной экспрессии в зависимости от основных клинических параметров. Выявлены дополнительные молекулярно-генетические факторы, связанные с клинико-морфологическими характеристиками эстроген-позитивного РМЖ.

© Т. А. Дронова, Н. Н. Бабышкина, С. В. Паталяк, С. В. Вторьшин, Е. М. Стонимская, Н. В. Чердынцева, 2020

* Работа поддержана грантом РФФИ, Соглашение 17-29-06037.

Abstract

Identification of biomarkers associated with breast cancer clinical characteristics remains one of the priority areas of fundamental research. The aim of the study was to examine the SNPs of *TGF-β1*, *TGF-βR1*, *TGF-βR2* gene as well as their protein and gene expression depending on the main clinical parameters. Additional molecular genetic factors related to the clinical and morphological characteristics of estrogen-positive breast cancer were identified.

Актуальность

Многофункциональность и вовлеченность белков семейства трансформирующего фактора роста бета 1 (*TGF-β1*) в координацию ключевых процессов в опухолевых клетках позволяет рассматривать их в качестве потенциальных молекулярных маркеров *.

Цель

Провести анализ однонуклеотидных замен в генах *TGF-β1*, *TGF-βR1*, *TGF-βR2* и их транскрипционной активности, а также анализ экспрессии кодируемых ими белков в зависимости от клинично-морфологических характеристик эстроген-позитивного РМЖ.

Материалы и методы

В исследование включена 141 пациентка с эстроген-позитивным РМЖ ($T_{1-4}N_{0-3}M_0$). Уровень экспрессии mRNA *TGF-β1*, *TGF-βR1*, *TGF-βR2*, SNPs *TGF-β1* (rs1800469, rs1800470), *TGF-βR1* (rs334354) и *TGF-βR2* (rs2228048) изучены с помощью ПЦР в режиме реального времени. Экспрессия белковых продуктов генов *TGF-β1*, *TGF-βR1*, *TGF-βR2* определена методом ИГХ.

Результаты

Носительство редких аллелей и генотипов полиморфизма rs334354 гена *TGF-βR1* значимо ассоциировано с отсутствием распространенности опухолевого процесса в регионарные лимфатические узлы ($p = 0,039$ и $0,006$ соответственно). Выявлена тенденция к повышению степени транскрипционной активности гена *TGFβ1* в опухоли у больных репродуктивного возраста ($p = 0,071$). При изучении особенностей экспрессии исследуемых белков у пациенток младше 50 лет отмечено увеличение содержания *TGF-βR1* в опухоли ($p = 0,030$). Установлен высокий уровень экспрессии *TGF-βR1*-пози-

* Liu S., Chen S., Zeng J. *TGF-β* signaling: A complex role in tumorigenesis (Review) // Mol Med Rep. 2018. Vol. 1. P.699–704.

тивных клеток у больных с гомогенным распределением эстрогеновых рецепторов в опухолевой ткани ($p = 0,028$).

Выводы

TGF- β 1 и его мембранный рецептор TGF- β R1 могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров, связанных с клиническими характеристиками эстроген-позитивного РМЖ.

**БИВАЛЕНТНЫЕ ДНК-УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ
СПЕЦИФИЧНЫХ РНК ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА****BIVALENT DNA-DEVICES FOR RNA-SPECIFIC INHIBITION
FOR CANCER THERAPY**

М. В. Дубовиченко ¹, Д. М. Колпашиков ^{1,2}

¹ *Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

² *Университет центральной Флориды, Орландо, США*

M. V. Dubovichenko ¹, D. M. Kolpashchikov ^{1,2}

¹ *SCAMT Laboratory, ITMO University, St. Petersburg*

² *University of Central Florida, USA*

E-mail: dubovichenko@scamt-itmo.ru

Аннотация

Мы разработали бивалентные ДНК-устройства на основе ДНКзимов, способные каталитически расщеплять мРНК гена домашнего хозяйства раковых клеток эффективнее, чем одинарные ДНКзимы. Повышение эффективности обусловлено наличием двух ДНКзимов, ассоциированных в одном ДНК-устройстве.

Abstract

We developed bivalent DNA-devices based on DNAzymes that catalytically cleave a housekeeping gene mRNA of cancer cells more effectively than single DNAzymes. The increase in efficiency is due to the presence of two DNAzymes associated in one DNA-device.

According to the World Health Organization, cancer is the leading causes of human death in the world: for 2018, every sixth death is due to cancer. One of the modern solutions to treat cancer is gene therapy. One of the most common variations of gene therapy is therapeutic oligonucleotides (TONs) used for suppression of target mRNA.

One of the significant disadvantages of TONs is loss effectiveness in interacting with the folded mRNA structure. Because of this problem, only 10 % of the injected TONs are interacting with the target mRNA [1]. Increasing the efficiency of TONs binding to folded RNA targets can reduce the therapeutically effective

complex secondary structures than that of the studied model RNA target as well as inside cells.

References

1. Zhou W. et al. Theranostic DNAzymes // *Theranostics*. 2017. № 4 (7). P. 1010–1025.
2. Song N. et al. Effect of siRNA-mediated knockdown of eIF3c gene on survival of colon cancer cells // *Journal of Zhejiang University*. 2013. № 6 (14). P. 451–459.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЙ ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

MOLECULAR GENETIC ENTERPRISES OF THE DEVELOPMENT OF LIVER PATHOLOGIES IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN THE REPUBLIC OF SAKHA (YAKUTIA)

А. Т. Дьяконова, Х. А. Куртанов, Н. И. Павлова, У. П. Борисова

Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск

A. T. Diakonova, H. A. Kurtanov, N. I. Pavlova, Y. P. Borisova

Yakut Scientific Center for Complex Medical Problems, Yakutsk

E-mail: dyakonovaa@bk.ru

Аннотация

Научные работы, проведенные в России и за рубежом, показывают частое сочетание СД 2-го типа и неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), которое характеризуется накоплением липидов как в самих гепатоцитах, так и в межклеточном пространстве. Исследование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs58542926 гена *TM6SF2* и rs738409 гена *PNPLA3* было проведено в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). Всего по гену *TM6SF2* выборка составила 142 образца ДНК, в том числе 48 образцов ДНК индивидов, имеющих в анамнезе хронические неинфекционные заболевания печени и 94 образца ДНК здоровых добровольцев. По гену *PNPLA3* было исследовано 397 образцов ДНК, в том числе 151 образец ДНК индивидов, имеющих в анамнезе хронические неинфекционные заболевания печени и 246 образцов ДНК здоровых добровольцев. Значение OR (95 % CI) для аллели *T* составило 5,257 (2,862–9,654), для гомозиготного генотипа *TT* — 10,227(3,165 — 33,047). При анализе распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма *PNPLA3* (rs738409) среди здоровой выборки и выборки пациентов с заболеваниями печени достоверных отличий не обнаружено.

Abstract

Scientific work in Russia and abroad shows a frequent combination of type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is characterized by the accumulation

of lipids in both the hepatocytes and in the intercellular space. The study of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of rs58542926 gene *TM6SF2* and rs738409 gene *PNPLA3* was carried out in the laboratory of hereditary pathology of the Department of Molecular Genetics of the Yakutsk Scientific Center for Complex Medical Problems (NSC KMP). In total, the *TM6SF2* gene sample consisted of 142 DNA samples, including 48 DNA samples of individuals with a history of chronic non-infectious liver diseases and 94 DNA samples from healthy volunteers. The OR value (95 % CI) for the T allele was 5,257 (2,862–9,654), for the TT homozygous genotype 10,227 (3,165–33,047). When analyzing the frequency distribution of genotypes and alleles of *PNPLA3* polymorphism (rs738409) among a healthy sample and a sample of patients with liver diseases, no significant differences were found.

Сахарный диабет 2-го типа (СД 2) является одной из наиболее социально значимых патологий в Республике Саха (Якутия). Распространенность НАЖБП среди пациентов СД 2-го типа составляет 60–80 %, а частота развития НАСГ — 12–40 % [1, 2]. Биологические механизмы, НАЖБП, приводящие к внепеченочным заболеваниям, полностью не установлены. Тем не менее совокупные данные убедительно свидетельствуют о том, что периферическая резистентность к инсулину, дислипидемия и активация воспалительных путей, связанных с НАЖБП, имеют отношение к развитию внепеченочных заболеваний, в том числе к СД 2-го типа.

Одним из кандидатных генов, вовлеченных в патогенез НАЖБП является пататинподобный фосфолипазный домен-содержащий белок 3 (*PNPLA3*), также известный как адипонутрин. Полиморфизм этого гена является предиктором прогрессирующего течения НАЖБП и основным фактором риска трансформации НАЖБП в цирроз. Исследования показывают, что полиморфизм I148M может представлять общий модификатор фиброгенеза при заболеваниях печени [3].

На сегодняшний день *TM6SF2* является одним из трех основных генов наряду с *PNPLA3* и *GSKR*, ассоциированных с НАЖБП. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs58542926 в гене *TM6SF2* представляет собой нуклеотидную замену гуанина на аденин, что в свою очередь приводит к замене глутаминовой кислоты лизином в 167 (E167K) аминокислотном остатке [4].

Материалы и методы исследования

Исследование полиморфизмов rs58542926 гена *TM6SF2* и rs738409 гена *PNPLA3* было проведено в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). Всего для гена *TM6SF2* было исследовано 142 образца ДНК, 48 образцов ДНК индивидов, имеющих в анамнезе хронические неинфекционные заболевания печени и 94 образца ДНК здоровых добро-

вольца. По гену *PNPLA3* было исследовано 397 образцов ДНК, 151 образцов ДНК индивидов, имеющих в анамнезе хронические неинфекционные заболевания печени и 246 образца ДНК здоровых добровольца. Выделение ДНК проводилось с помощью коммерческого набора. Однонуклеотидный полиморфизм определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Статистический анализ проведен с помощью программы Office Microsoft Excel 2010 и Statistica 8.0. Частоты полиморфизмов определяли путем прямого подсчета. Результаты считаются значимыми, когда значение p меньше, чем 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ распределения аллелей полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* установил, что группа больных так же, как и группа здоровых, характеризовалась преобладанием носителей аллеля С 62 и 88 % соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Распределения встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs58542926 в группе больных и контрольной выборки

Генотипы, аллели	Больные ($n = 48$), (%)	Контрольная выборка ($n = 94$), (%)	χ^2	OR (95 % CI) для аллели T	Значи- мость, p
C/C	54,17	81,91	20,691	5,257 (2,862–9,654)	0,000 *
C/T	14,58	13,83			
T/T	31,25	4,26			
C	64,7	88,8	27,636		0,000 **
T	35,3	11,2			

Примечание. Достигнутый уровень значимости при сравнении распределения генотипов (*) и частоты аллелей (**) в группах сравнения больных и контрольной выборки, n — численность выборок, χ^2 с поправкой Йейтса.

Сравнительный анализ генотипов в группах больных и здоровых выявил преобладание лиц с генотипом CC (54 и 82 % соответственно). При этом генотип TT достоверно чаще встречался в группе лиц с хроническими

неинфекционными заболеваниями печени (31 %, $p \leq 0,005$). Значение OR (95 % CI) для аллеля *T* составило 5,257 (2,862–9,654), для гомозиготного генотипа *TT* — 10,227 (3,165–33,047).

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного гена *PNPLA3* (rs738409) в выборке якутов, страдающих СД 2-го типа, выявил преобладание генотипа *GG* (60,3 %), значительно реже — генотип *CC* (9,9 %). Гетерозиготный генотип *GC* наблюдали у 29,8 % пациентов. Анализ распределения аллелей полиморфного локуса *PNPLA3* (rs738409) показал более высокую частоту аллеля *G* — 75,2 %. Аллель *C* встречается у якутов с частотой 24,8 %. Распределение генотипов полиморфизма rs738409 находилось в равновесии Харди — Вайнберга в исследованной выборке ($p > 0,05$). При анализе распределение частот генотипов и аллелей среди здоровой выборки и выборки пациентов с заболеваниями печени достоверных отличий не обнаружено. Частоты генотипов полиморфизма *PNPLA3* (rs738409) приведены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнение частот генотипов и аллелей среди больных и здоровых якутов

Генотипы, аллели	Больные ($n = 151$) (%)	Контрольная выборка ($n = 246$) (%)	χ^2	OR (95 % CI) для аллели <i>G</i>	Значимость, <i>P</i>
<i>C/C</i>	9,9	13,8	1,535	1,121 (0,808–1,557)	0,464 *
<i>C/G</i>	29,8	26,4			
<i>G/G</i>	60,3	59,8			
<i>C</i>	24,8	27,0	0,361		0,548 **
<i>G</i>	75,2	73,0			

Примечание. Достигнутый уровень значимости при сравнении распределения генотипов (*) и частоты аллелей (**) в группах сравнения 1 и 2; *n* — численность выборок, χ^2 с поправкой Йейтса.

Заключение

Сравнительный анализ распределения аллелей полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* установил, что группа больных так же, как и группа здоровых характеризовалась преобладанием носителей аллеля *C* 62 и 88 % соответственно. Сравнительный анализ генотипов в группах больных и здоровых выявил преобладание лиц с генотипом *CC* (54 и 82 % соответ-

ственно). При этом генотип *TT* достоверно чаще встречался в группе лиц с хроническими неинфекционными заболеваниями печени (31 %, $p \leq 0,005$). Значение OR (95 % CI) для аллеля *T* составило 5,257 (2,862–9,654), для гомозиготного генотипа *TT* 10,227 (3,165–33,047).

Литература

1. Петунина Н. А., Тельнова М. Э. Неалкогольная жировая болезнь печени // Медицинский совет. 2016. № 4. С. 92–95.
2. Шаронова Л. А., Вербовой А. Ф., Вербовая Н. И., Пашенцева А. В. Взаимосвязь неалкогольной жировой болезни печени и сахарного диабета 2-го типа // РМЖ. 2017. № 22. С. 1635–1640.5.
3. Dongiovanni P., Donati B., Fares R., Lombardi R., Mancina R.M., Romeo S., Valenti L. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease // World Journal of Gastroenterology. 2013. Vol. 19. № 41. P. 6969–6978. doi: 10.3748/wjg.v19.i41.6969.
4. Vespasiani-Gentilucci U., Dell'Unto C., De Vincentis A., Baiocchini A., Delle Monache M., Cecere R. Combining Genetic Variants to Improve Risk Prediction for NAFLD and Its Progression to Cirrhosis: A Proof of Concept Study // Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2018. Vol. 2018. P. 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/7564835>

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОЙ ДЕПЛЕЦИИ РНК-МИШЕНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ЗОНДОВ И РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ ***A DEVELOPMENT OF APPROACH TO HIGH-SPECIFIC RNA-DEPLETION USING PHOSPHORYLGUANIDINE PROBES AND REVERSE TRANSCRIPTION REACTION**

Е. С. Дюдеева

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

E. S. Dyudeeva

*Institute of Chemical Biology
and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

E-mail: jenyadudeeva@gmail.com

Аннотация

Фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды (ФГ-ОН) — тип незаряженных синтетических нуклеиновых кислот (НК), обладающих способностью связывать комплементарную мишень даже в растворах с ультранизкой ионной силой. Показано, что комплекс ФГ-ОН с РНК может выступать в качестве субстрата для обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы). Полученные результаты являются базисом для разработки подхода к высокоселективной деплеции РНК, основанной на уникальных гибридизационных свойствах ФГ-ОН и его ферментативном удлинении обратной транскриптазой.

Abstract

Phosphorylguanidine oligonucleotides (PG-ON) is a type of uncharged synthetic nucleic acids (NA), which is able to bind the complementary target even if the ionic strength of the solution is ultra-low. It was shown that PG-ON primer with RNA template may be a substrate for reverse transcriptase (RNA-dependent DNA-polymerase). The results obtained is a basis for development of approach to high-selective RNA depletion, based on unique hybridization properties of PG-ON and its enzymatic elongation by reverse transcriptase.

Фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды — перспективный класс незаряженных синтетических НК [1]. Ранее были исследованы гибридизационные свойства полностью и частично модифицированных ФГ-ОН [1–3]: показано, что они способны образовывать комплексы с комплементарной НК-мишенью даже в деионизованной воде, в то время как стабильность нативных комплексов аналогичного нуклеотидного состава резко падает при понижении ионной силы раствора. Данное свойство ФГ-ОН может быть перспективным в контексте «захвата» высокоструктурированных РНК-мишеней: низкая ионная сила будет дестабилизировать внутреннюю структуру мишени, делая ее более «доступной» для связывания с ФГ-праймером.

Цель данной работы — апробация комплексов, содержащих ФГ-ОН, как субстратов для реакции обратной транскрипции (ОТ). Используя модельный субстрат, образованный 10-звенным ДНК-праймером и 17-звенной РНК-матрицей, проведен систематический поиск оптимальных условий реакции ОТ: варьировали температуру реакции, концентрацию dNTP и самого субстрата, количество фермента. В результате выбраны оптимальные условия, при которых количество abortивных продуктов элонгации было минимальным. Продемонстрировано, что эффективность удлинения обратной транскриптазой нативного N10° и полностью фосфорилгуанидинового праймера N10*, остов которого не имеет заряда, близка в присутствии 5 mM MgCl₂. При понижении ионной силы буферного раствора реакционной смеси установлено, что ФГ-ОН, даже обладая полностью модифицированным остовом, может выступать в качестве праймера для реакции ОТ. Эффективность удлинения праймера в этом случае лишь несколько уменьшается. Таким образом, полученные результаты могут быть базисом для разработки подхода к селективному захвату высокоструктурированных РНК с помощью ферментативного удлинения ФГ-праймеров при пониженной ионной силе среды.

Литература

1. Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. Phosphoryl Guanidines: A New Type of Nucleic Acid Analogues // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. P. 116–118.
2. Lomzov A. A., Gorelov V. V., Golyshv V. M., Abramova T. V., Pyshnyi D. V. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2015. V. 33. P. 90–91.
3. Dyudeeva E. S., Kupryushkin M. S., Lomzov A. A., Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V. Physicochemical Properties of the Phosphoryl Guanidine Oligodeoxyribonucleotide Analogs // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 709–718. doi 10.1134/S1068162019060153

**ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА СВОЙСТВА
ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ *****EFFECTS OF LONG-TERM HYPOXIA ON CANCER ASSOCIATED
FIBROBLAST PROPERTIES**

М. С. Ермаков ^{1,2}, О. А. Коваль ^{1,2}, А. А. Нуштаева ¹

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Новосибирский государственный университет*

M. S. Ermakov ^{1,2}, O. A. Koval ^{1,2}, A. A. Nushtaeva ¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
² *Novosibirsk State University*

E-mail: ermakovm97@gmail.com

Аннотация

В результате выполнения работы показано, что при культивировании опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ) в условиях длительной гипоксии наблюдается изменение уровня мРНК протоонкогена *c-myc* и генов-регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). При подкожной трансплантации иммунодефицитным мышам ОАФ, культивируемых в условиях гипоксии, образовывались опухолевые узлы, в отличие от клеток, культивируемых в нормоксии.

Abstract

In this work, we demonstrated that long-term cultivation of cancer associated fibroblast (CAFs) under hypoxic conditions promotes the expression of proto-oncogene *c-myc* and transcriptional factors that regulates epithelial to mesenchymal transition. Furthermore, CAFs cultivated under hypoxia become tumorigenic in immunodeficient mice in compare with CAFs cultivated in normoxia.

Микроокружение опухоли оказывает влияние на пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование. ОАФ являются основным

© М. С. Ермаков, О. А. Коваль, А. А. Нуштаева, 2020

* Исследование поддержано грантом РФФ № 20-74-10039.

типом стромальных клеток в опухоли и могут участвовать в регуляции адаптации опухоли к стрессовым условиям, в том числе гипоксии. Гипоксия усиливает инвазивность ОАФ. Адаптацию клеток к гипоксии регулируют многие факторы, такие как регуляторы экспрессии генов, связанных с ЭМП. Экспрессия протоонкогена *c-myc* находится под контролем факторов, индуцируемых гипоксией (HIF), он играет критическую роль в пролиферации и метаболизме клеток.

Целью исследования являлось выявление изменения экспрессии мРНК генов-регуляторов ЭМП в ОАФ в условиях гипоксии, а также изучение влияния гипоксии на туморогенность ОАФ при подкожной трансплантации иммунодефицитным мышам.

В работе использовали полученную ранее персонализированную культуру клеток рака молочной железы BrC4f с фибробластоподобным фенотипом. Для реализации условий гипоксии использовали разработанный ранее метод «импульсной гипоксии». Показано, что несколько раундов гипоксии стимулировали изменение фенотипа клеток с фибробластоподобного в эпителиоподобный. После двух раундов «импульсной гипоксии» клетки BrC4f использовали для выделения суммарной РНК или для подкожной трансплантации мышам линии SCID. В качестве контроля использовали клетки BrC4f, культивируемые в условиях нормоксии.

Было показано, что после одного раунда гипоксии повышается уровень мРНК ключевого гена-регулятора ЭМП — SLUG, однако после двух раундов — мРНК SLUG, и *Zeb1* снижался до уровня мРНК этих генов в клетках культуры с эпителиальным фенотипом, что, вероятно, связано с активацией в ОАФ обратного ЭМП процесса — мезенхимально-эпителиального перехода при длительной гипоксии. После двух раундов гипоксии в ОАФ наблюдается повышение уровня мРНК *c-myc* в сравнении с нормоксией.

При подкожной трансплантации клеток BrC4f после двух раундов гипоксии опухолевый узел образовывался на 12–14 день после трансплантации. При перевивании клеток, культивируемых в условиях нормоксии, не наблюдается формирование опухоли на месте введения клеток.

Полученные данные демонстрируют, что длительная гипоксия является регулятором мезенхимально-эпителиального перехода в ОАФ и индуцирует туморогенность ОАФ.

**ГИСТОН-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА
ПРИ ШИЗОФРЕНИИ: ВЗАИМОСВЯЗЬ ВОСПАЛЕНИЯ
И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ***

**HISTONE-HYDROLYZING ANTIBODIES IN SCHIZOPHRENIA:
THE RELATIONSHIP BETWEEN INFLAMMATION
AND HUMORAL IMMUNITY**

Е. А. Ермаков^{1,2}, В. Н. Бунева^{1,2}, Г. А. Невинский^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет

² Институт химической биологии

и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. A. Ermakov^{1,2}, V. N. Buneva^{1,2}, G. A. Nevinsky^{1,2}

¹ Novosibirsk State University

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

E-mail: evgeny_ermakov@mail.ru

Аннотация

Известно, что шизофрения связана с иммунными нарушениями. В данной работе обнаружено, что IgG из сыворотки больных шизофренией способны связывать и гидролизовать различные гистоны. Поскольку внеклеточные гистоны запускают воспалительные реакции, такие антитела играют защитную роль при шизофрении и являются перспективными биомаркерами.

Abstract

Schizophrenia is known to be associated with immune pathology. In this work, it was found that IgG from the serum of schizophrenic patients is able to bind and hydrolyze various histones. Since extracellular histones trigger inflammatory responses, such antibodies play a protective role in schizophrenia and are promising biomarkers.

Шизофрения связана не только с нейротрансмиттерным дисбалансом, но и с дисрегуляцией иммунной системы и хроническим вялотекущим вос-

© Е. А. Ермаков, В. Н. Бунева, Г. А. Невинский, 2020

* Исследования поддержаны грантом РФФИ 20-015-00156, а также Стипендией Президента РФ № СП-2258.2019.4.

палением. Однако патологические процессы, приводящие к этому, до сих пор плохо изучены. Известно, что внеклеточные гистоны, попадающие во внеклеточное пространство вследствие апоптоза и других вариантов клеточной гибели, инициируют воспалительные реакции. У больных шизофренией обнаружены антинуклеарные и антигистоновые антитела в низкой концентрации. Известно, что среди огромного репертуара антител организма присутствуют каталитические антитела, которые связывают и гидролизуют антиген. Такая неканоническая функция антител расширяет функциональные возможности иммунной системы, но в некоторых случаях может приводить к патологии*.

В этой работе мы показали, что поликлональные IgG у больных шизофренией не только эффективно связывают, но и гидролизуют пять гистонов (H1, H2a, H2b, H3 и H4). Препараты IgG были получены из сыворотки крови 25 больных и 15 здоровых доноров методом аффинной хроматографии. Для доказательства их гомогенности использовался SDS-PAGE и MALDI-TOF MS. Анализ гидролитической активности IgG проводили с помощью SDS-PAGE после инкубации IgG с гистонами. Уровень каталитической активности (%) оценивали по снижению интенсивности пятна гистона после инкубации с IgG. С использованием общепринятых жестких критериев доказано, что каталитическую активность проявляют непосредственно анализируемые IgG. Уровень гистон-гидролизующей активности IgG в зависимости от типа гистона оказался статистически значимо в 6–20,1 раз выше, чем у условно здоровых доноров. Исследованные биохимические свойства этих естественных каталитических IgG заметно отличались от канонических протеаз. Образование каталитических антител является признаком нарушений в иммунной системе больных. С другой стороны, разрушение внеклеточных гистонов снижает воспалительные реакции. Можно предположить, что гистон-гидролизующие антитела являются связующим элементом между гуморальным иммунитетом и воспалительными реакциями при шизофрении.

Полученные результаты дополняют имеющиеся данные о связи воспаления и гуморальной иммунной системы при шизофрении. Каталитические IgG могут оказаться перспективными биомаркерами шизофрении и других заболеваний.

*Ermakov E. A., Nevinsky G. A., Buneva V. N. Immunoglobulins with non-canonical functions in inflammatory and autoimmune disease states // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. № 15. P.5392.

**LOLA — БЫСТРЫЙ И ПРОСТОЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ
ОНКОГЕННЫХ ПЕРЕСТРОЕК T(4;11)(Q21;Q23) *****LOLA — FAST AND EASY METHOD FOR THE DETECTION
OF THE ONCOGENIC TRANSLOCATION T(4;11)(Q21;Q23)**А. В. Замалутдинов ¹, Н. А. Ломов ¹, Е. А. Зеркаленкова ², М. А. Рубцов ^{1,3}¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова²Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева³Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. СеченоваA. V. Zamalu Itdinov ¹, N. A. Lomov ¹, E. A. Zerkalenkova ², M. A. Rubtsov ^{1,3}¹Lomonosov Moscow State University²Dmitry Rogachev National Research Center, Moscow³Sechenov University, Moscow

E-mail: avzamal@yandex.ru, lomov13@gmail.com

Аннотация

Хромосомная перестройка *MLL-AF4* ассоциирована с острым лейкозом. Для ее детекции в настоящее время применяется метод FISH. Мы адаптировали для детекции этой перестройки метод лигирования запетленных участков (LOLA), который проще и быстрее, чем FISH-анализ.

Abstract

MLL-AF4 chromosomal translocation is associated with acute leukemia. Nowadays, FISH method is used for translocation detection. For this purpose, we adapted DNA-based Loop Ligation Assay (LOLA), which is easier and faster than FISH-analysis.

Лейкозы часто сопровождаются хромосомными перестройками с участием гена лизиновой гистонметилтрансферазы *MLL (KMT2A)*, в результате он сшивается с одним из многочисленных генов-партнеров. Тип перестройки влияет на прогноз и применяемые подходы к лечению. Проблема

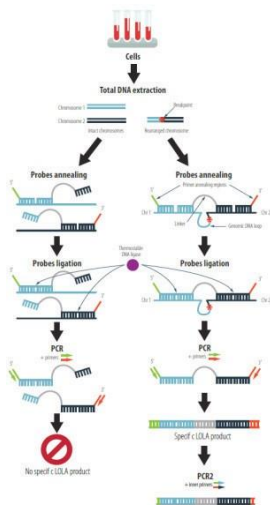
© А. В. Замалутдинов, Н. А. Ломов, Е. А. Зеркаленкова, М. А. Рубцов, 2020

* Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 19-75-10056).

выявления перестройки состоит в том, что возможные точки разрывов лежат на протяженном участке (кластере разрывов) гена, что осложняет детекцию перестройки простыми методами, например, ПЦР. В настоящее время используется техника флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с двуцветными (dual color) пробами. Однако этот метод довольно дорог, сложен и занимает несколько дней.

Метод лигирования запетленных участков (Loop Ligation Assay, LOLA) позволяет детектировать спектр транслокаций, отличающихся локализацией точки разрыва на протяжении сотен тысяч пар нуклеотидов.

Метод заключается в отжиге в области транслокации в непосредственной близости друг к другу трех олигонуклеотидов, их дальнейшем лигировании и детекции образовавшегося продукта. Боковые олигонуклеотиды комплементарны участкам двух генов-партнеров по перестройке, а также содержат некомплемментарные хромосоме концы, на которых отжигаются универсальные праймеры. Концы среднего олигонуклеотида комплементарны двум удаленным участкам слитой хромосомы, а его средняя часть представляет собой линкер, позволяющий сблизить участки химерного гена с образованием петли. Если перестройка присутствует в ДНК, то пробы лигируются друг с другом и продукт лигирования детектируется методом ПЦР. Принцип проиллюстрирован на рисунке.



Принцип метода LOLA

Мы детектировали транслокацию *MLL-AF4* как одну из самых частых транслокаций гена *MLL*, наблюдаемых при острых лейкозах, особенно у детей первого года жизни. Для повышения специфичности метода мы применили стратегию вложенной ПЦР и провели подбор условий реакций.

ДНК выделяли из образцов костного мозга пациентов, полученного в период развернутого течения заболевания. Образцы содержали по крайней мере 80 % бластных клеток. Наличие транслокации $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$ было доказано методами стандартного кариотипирования, FISH и ПЦР с обратной транскрипцией.

Метод является достаточно быстрым, дешевым, не требует сохранности клеток в образцах и в перспективе может заменять FISH. Ограничением метода является качество анализируемой геномной ДНК.

Информированное согласие на диагностическое обследование было получено от законных представителей всех пациентов.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА МЕТОДОМ АСМ В РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ СКАНИРОВАНИЯ

VISUALIZATION OF HORSERADISH PEROXIDASE BY AFM IN VARIOUS SCANNING MODES

И. А. Иванова, М. О. Ершова, Т. О. Плешакова, Ю. Д. Иванов

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
им. В. Н. Ореховича, Москва*

I. A. Ivanova, M. O. Ershova, T. O. Pleshakova, Yu. D. Ivanov

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

E-mail: i.a.ivanova@bk.ru

Аннотация

Единичные белковые молекулы пероксидазы хрена (ПХ) визуализированы методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Данные сканирования получены в режиме ScanAsyst[†] и в полуконтактном режиме на приборах NTEGRA Aura (NT-MDT, Зеленоград, Россия) (далее Aura) и Dimension FastScan Bio[™] (Bruker, США) (далее DFS). Показана сопоставимость результатов измерений, полученных в одном режиме на различных приборах.

Abstract

Single molecules of horseradish peroxidase (HRP) protein have been visualized by atomic force microscopy (AFM). The AFM data were obtained in ScanAsyst[†] mode and in tapping mode using NTEGRA Aura (NT-MDT, Zelenograd, Russia) and Dimension FastScan Bio[™] (Bruker, USA) atomic force microscopes. The comparability of the results, obtained in the same mode with different atomic force microscopes, has been demonstrated.

Атомно-силовая микроскопия позволяет получать информацию, необходимую для изучения физико-химических свойств единичных макромолекул и макромолекулярных комплексов [1]. Полуконтактный режим молекулярного детектора АСМ используется для визуализации иммобилизованных на атомарно ровную поверхность белков. В этом режиме происходит более деликатное воздействие зонда на объекты. Цель данной рабо-

ты — проанализировать и сопоставить результаты измерений, полученных с помощью разных приборов.

В качестве объекта исследования был взят хорошо охарактеризованный гемсодержащий фермент — пероксидаза хрена. В настоящее время ПХ широко используется для моделирования структуры и функции ферментов, что дает возможность разработать подходы для создания новых методов диагностики заболеваний с использованием молекулярных детекторов [2].

В результате работы получены АСМ-изображения поверхности свежесколотой слюды с биомолекулами, сорбированными из 10^{-7} М буферного раствора ПХ (рис. 1, *а–в*). Образцы приготовлены в идентичных условиях.

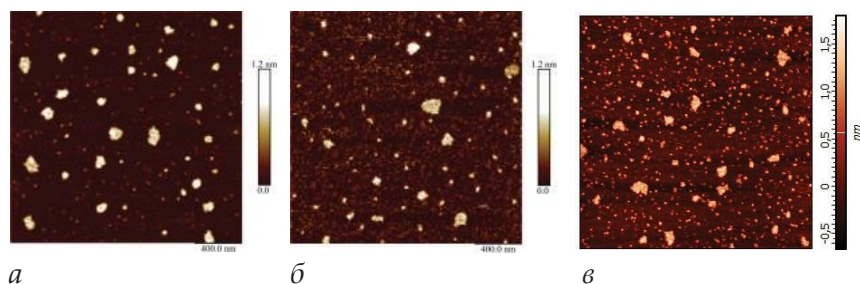


Рис. 1. Пример АСМ-изображений молекул белка ПХ, сорбированных на поверхности слюды, полученных в режиме ScanAsyst (*а*) и в полуконтактном режиме на приборах (*б*) DFS, Aura (*в*)

Результаты АСМ-сканирования были обработаны, построена функция распределения визуализированных объектов по высотам h (рис. 2). Как видно на рис. 2, максимум распределения для всех режимов измерений совпадает и составляет 1,3,2 нм. Согласно [2] объекты с высотой $\approx 1,2$ нм соответствуют мономерам ПХ. Следовательно, при использовании полуконтактного режима измерения на обоих приборах визуализируются преимущественно мономеры белка. Однако для данных, полученных в режиме ScanAsyst, наблюдается увеличение вклада частиц в правое крыло распределения, т. е. фиксируются объекты с большими высотами. Это означает, что в данном режиме также визуализируются олигомерные структуры белка. Следовательно, воздействие зонда на биомакромолекулы в этом режиме является более деликатным по сравнению со стандартным полуконтактным режимом.

Результаты работы показали, что при сопоставлении АСМ-данных необходимо учитывать прибор и режимы сканирования, использованные для проведения измерений.

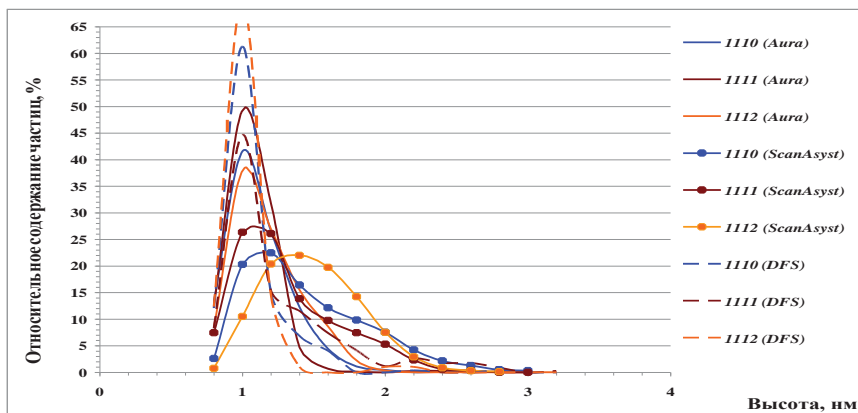


Рис. 2. Функция распределения визуализированных объектов по высотам: данные, полученные в режиме ScanAsyst (линии с маркерами), в полуконтактном режиме на приборах DFS (пунктирные линии), Aura (сплошные линии). Приведены результаты трех технических повторов для каждого образца (см. кодировку цветом в легенде)

Литературы

1. Ivanov Y. D. et al. AfM imaging of protein Aggregation in Studying the impact of Knotted electromagnetic field on A peroxidase // Scientific Reports. 2020. Vol. 10. №. 1. P. 1–9.
2. Veitch N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // Phytochemistry. 2004. Vol. 65. №. 3. P. 249–259.

**НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ЦИАНО-ЕНОН-СОДЕРЖАЩИХ
ТРИТЕРПЕНОИДОВ: ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ГЛИО- И НЕЙРОБЛАСТОМ ***

NOVEL GENERATION OF CYANO-ENONE-BEARING TRITERPENOIDS:
ANTITUMOR POTENTIAL
AGAINST GLIO- AND NEUROBLASTOMA CELLS

А. А. Ильина^{1,2}, О. В. Саломатина^{1,3}, Н. Ф. Салахутдинов³,
М. А. Зенкова¹, А. В. Марков¹

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Новосибирский институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*

A. A. Ilyina^{1,2}, O. V. Salomatina^{1,3}, N. F. Salakhutdinov³,
M. A. Zenkova¹, A. V. Markov¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

² *Novosibirsk State University*

³ *N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

E-mail: humanity2206@mail.ru

Аннотация

Проведен скрининг противоопухолевой активности 9 новых амидов солоксона в отношении клеток глио- и нейробластом человека и мыши. Установлено, что лидерное соединение jil-7, несущее триптамидный заместитель, способно проникать сквозь гемато-энцефалический барьер (ГЭБ), вызывать гибель опухолевых клеток путем индукции каспазо-зависимого апоптоза предположительно в результате прямого взаимодействия с Akt1 и CHRM2 и блокировать подвижность клеток глиобластомы.

Abstract

The screening of antitumor activity of 9 novel amides of soloxolone in human and murine glio- and neuroblastoma cells was carried out. It was found that hit compound jil-7,

© А. А. Ильина, О. В. Саломатина, Н. Ф. Салахутдинов, М. А. Зенкова, А. В. Марков, 2020

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 17-75-20120.

bearing tryptamide moiety, can pass through blood-brain barrier, induced caspase-dependent apoptosis probably via direct interaction with Akt1 and CHRM2 and blocked motility of glioblastoma cells.

Известно, что введение циано-еноновой фармакофорной группы в структуру полициклических соединений приводит к значительному усилению уровня их биоактивности. Полусинтетический тритерпеноид CDDO, несущий данную модификацию, и ряд его аналогов в настоящее время находятся на различных фазах клинических испытаний на пациентах с широким рядом заболеваний, в том числе онкологических [1]. Ранее нашей группой на основе 18 β H-глицирретовой кислоты был синтезирован и исследован аналог CDDO солоксолон метил (СМ), способный эффективно ингибировать опухолевый рост, развитие воспалительного ответа и гриппозную инфекцию *in vitro* и *in vivo*. Учитывая установленную в [2] взаимосвязь между формированием амидной группы в области кольца E CDDO и высоким уровнем накопления таких производных в тканях мозга мышей, целью настоящей работы являлся синтез амидов солоксолон и исследование их противоопухолевого потенциала в отношении клеток опухолей головного мозга.

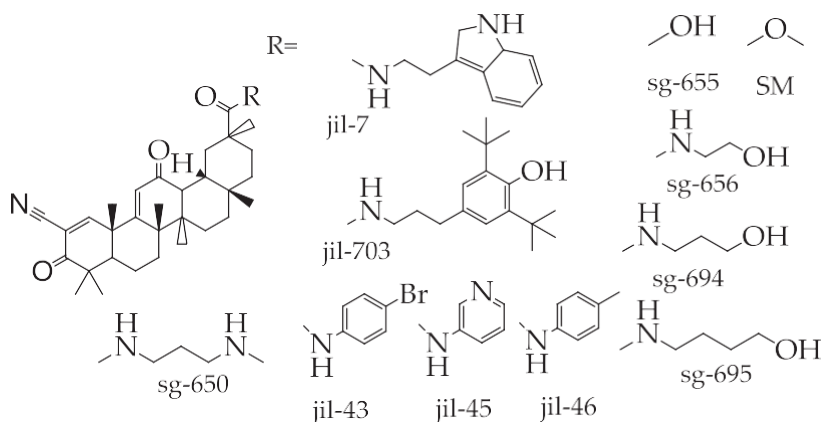


Рис. 1. Химические структуры новых аналогов СМ

На первом этапе работ было синтезировано 9 новых амидов солоксолон, несущих различные алифатические и ароматические заместители (рис. 1), и проведен скрининг их способности проникать через ГЭБ с использовани-

ем двух независимых онлайн-платформ AlzPlatform и PreADMET. Показано, что 5 из 9 синтезированных производных потенциально способны накапливаться в мозге (рис. 2, А). Оценка цитотоксичности отобранных амидов на клетках глио- и нейробластом человека и мыши показала их высокую цитотоксичность (медианная $IC_{50} = 1,9 \mu\text{M}$) за исключением sg-650, несущего N-метилпропан-1,3-диаминовый заместитель (рис. 2, Б). Кроме этого, в результате *in silico* анализа было установлено, что 3 из 5 выявленных амидов солоксолон не являются субстратом для р-гликопротеина (рис. 2, Б), входящего в структуру ГЭБ и выполняющего откачку ксенобиотиков из мозга обратно в кровяное русло.

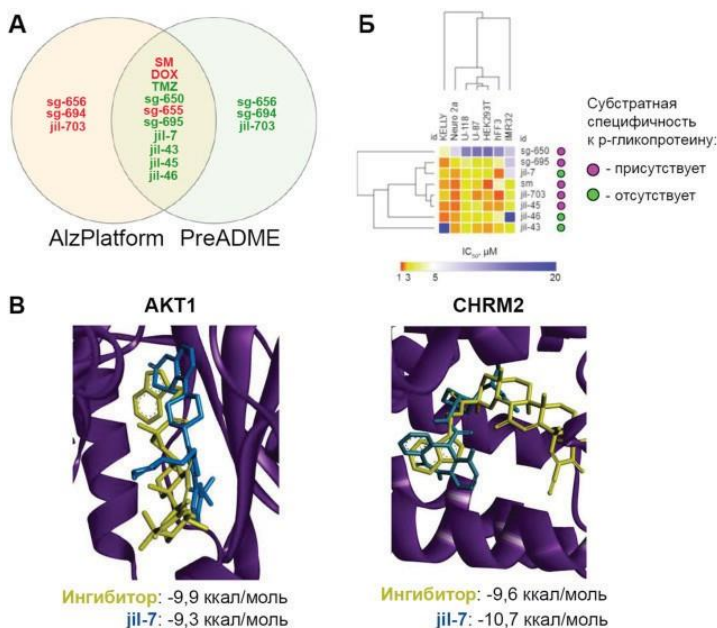


Рис. 2. А. Потенциальная способность новых производных солоксолон проникать сквозь ГЭБ. Зеленым и красным цветом отмечены соединения, обладающие и не обладающие данной активностью соответственно.

Б. Профиль цитотоксичности новых производных солоксолон.

В. Докинг-комплексы jil-7 (синий) с Akt1 и CHR2 в сайтах связывания их селективных ингибиторов (желтый)

В результате более детального изучения механизмов цитотоксического действия соединения-лидера jil-7 выявлена его способность запускать апоптоз (экстернализация фосфатидилсерина, активация каспаз-3/-7) и усиливать митохондриальный мембранный потенциал в клетках глиобластом человека U-87 и U-118. Кроме этого, на данной модели с использованием scratch-теста и технологии xCelligence установлено, что jil-7 в нетоксичных концентрациях эффективно ингибирует подвижность опухолевых клеток.

На следующем этапе работы с использованием *in silico* подхода на основе машинного обучения был идентифицирован список потенциальных белковых мишеней jil-7, которые далее были внедрены в генную ассоциативную сеть, связанную с запуском апоптоза. В результате анализа полученной сети с последующей валидацией молекулярным докингом было установлено, что киназа Akt1 и мускариновый ацетилхолиновый рецептор CHRМ2 могут рассматриваться в качестве первичных мишеней jil-7, определяющих его проапоптотическую активность (рис. 2, В).

Литература

1. Markov A. V., Zenkova M. A., Logashenko E. B. Modulation of Tumour-Related Signaling Pathways by Natural Pentacyclic Triterpenoids and their Semisynthetic Derivatives // *Curr. Med. Chem.* 2017. Vol. 24. P. 1277–1320, doi:10.2174/0929867324666170112115313.
2. Yang L., Calingasan N. Y., Thomas B., Charturvedi R. K., Kiaei M., Wille E. J., Liby K. T., Williams C., Royce D., Risingson R. et al. Neuroprotective effects of the triterpenoid, CDDO methyl amide, a potent inducer of Nrf2-mediated transcription // *PLoS One.* 2009. Vol. 4, e5757, doi:10.1371/journal.pone.0005757.

**ЭВОЛЮЦИЯ мтДНК МЛЕКОПИТАЮЩИХ:
МЫШИ ХОДЯТ МНОГИМИ МАЛЕНЬКИМИ ШАГАМИ,
СЛОНЫ — РЕДКИМИ БОЛЬШИМИ**

**mtDNA MAMMALIAN EVOLUTION:
MICE WALK WITH MANY LITTLE STEPS
WHILE ELEPHANTS WITH A FEW BIG ONES**

Д. В. Ильющенко ¹, К. В. Гунбин ², К. Ю. Попадѳин ¹

*¹Балтийский федеральный университет
им. Иммануила Канта, Калининград*

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

D. V. Iliushchenko ¹, K. V. Gunbin, K. Yu. Popadin ¹

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

²Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

E-mail: iliushchenkodmitrii@gmail.com

Аннотация

В этом проекте мы используем выровненные митохондриальные геномы (353 вида, 40 семейств, 13 генов), чтобы проверить гипотезу о том, что с уменьшением массы тела скорость эволюции будет быстрее из-за очень нейтральных замен, а с увеличением веса тела будет увеличиваться скорость эволюции из-за более радикальных замен.

Abstract

In this project, we use aligned mitochondrial genomes (353 species, 40 families, 13 genes) to test the hypothesis that, with a decrease in body weight, the rate of evolution will be faster due to very neutral substitutions, and with an increase in body weight there will be an increase in the rate of evolution overdue to more radical substitutions.

Introduction

Numerous associations of ecological and genetic traits are especially well known for mammalian species — which are well characterized ecologically and deeply sequenced. It is known, that small-bodied short-lived (mice) mammalian

species have a higher rate of neutral evolution as compared to large-bodied long-lived (elephants) species. Most likely this effect is driven by the different number of DNA replications of germ cells per unit of time (higher in mice versus elephants). Also, it is known that slightly-deleterious variants, opposite to the neutral mutations, tend to accumulate faster in elephants versus mice because of their lower effective population size which leads to stronger genetic drift. Interestingly, both these most common categories of mutations together very often lead to an approximately constant rate of molecular evolution: mice accumulate numerous neutral substitutions, while elephants accumulate more rare and more deleterious variants. Here we use mitochondrial genomes to test the hypothesis that in physicochemical space “mice walk with many little steps while elephants with a few big ones”.

Methods

Mitochondrial genes, which we used in this project allow us to analyze mammalian species with a complete sequenced mtDNA. We plan to find a physicochemical metrics of mtDNA evolution to analyze mice-specific and elephant-specific patterns of amino-acid substitutions.

Using codon alignment of mitochondrial genes we generated all possible trios of species within each family. For each species from each trio, we obtained generation length as the main ecological factor. The approach is based on the relative ratio test: we compare two species B and C with different generation length. If species B is more long-lived as compared to species C we expect that the rate of neutral evolution will be decreased during the B-specific evolution, while the rate of accumulation of slightly-deleterious variants will be increased. To test it we use an outgroup species A to analyze the pattern of evolution between A-B and A-C. Finally, we work with different outgroups for each pair of species to demonstrate the robustness of the observed effects.

Results

Our pilot results from the comparative-species scale demonstrate the expected trend: long-lived species tend to accumulate more distant amino-acid substitutions as compared to short-lived species. Currently, we use additional properties of amino-acids to find a physicochemical signature of substitutions typical for short-lived versus long-lived species.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ОККЛЮДИНА, КЛАУДИНА
И E-КАДГЕРИНА В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ
АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

EXPRESSION LEVEL OF OCCLUDIN, CLAUDIN AND E-CADHERIN
IN A CELL MODEL OF ATOPIC DERMATITIS

Е. Л. Искра

*Государственный Санкт-Петербургский
педиатрический медицинский университет*

E. L. Iskra

St. Petersburg State Pediatric Medical University

E-mail: e.iskra.doc@mail.ru

Аннотация

Плотные контакты — запирающие межклеточные контакты — максимально сшиты специализированными белками клаудинами и окклюдинами. Роль плотных контактов заключается в ограничении и регулировании параклеточной диффузии. Клаудины и кадгеринины отвечают за формирование связей между однотипными эндотелиальными клетками. С нарушением формирования плотных контактов связаны различные заболевания человека, в том числе атопический дерматит. Плотные контакты могут быть мишенью для вирусных и бактериальных патогенов, что характерно для атопического дерматита.

Abstract

Tight contacts-locking intercellular contacts are maximally cross-linked by specialized proteins claudins and occludins. The role of tight contacts is to limit and regulate paracellular diffusion. Claudins and cadherins are responsible for forming connections between the same type of endothelial cells. Various human diseases, including atopic dermatitis, are associated with the violation of the formation of dense contacts. Close contacts can be a target for viral and bacterial pathogens, which is typical for atopic dermatitis.

Цель исследования — изучение уровня экспрессии окклюдина, клаудина и кадгерина в клеточной культуре атопического дерматита с целью оценки нарушения плотных контактов при данной патологии.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на клеточной культуре atopического дерматита. Иммуногистохимическая реакция была проведена с первичными антителами к маркерам Claudin 10 Antibody, Occludin Antibody, E-Cadherin (Affinity Biosciences, 1:150). В качестве вторичных антител использовали Alexa 647; ядра докрашивали DAPI. Для изучения объектов получали спектры флуоресценции и определяли количественные характеристики на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 800. Флуоресценцию с определенными спектральными характеристиками регистрировали в плоскости (по оси X-2D). Уровень экспрессии антител определяли с помощью программы ImageJ как относительную площадь экспрессии.

Результаты исследования

Результаты исследования показали, что среднее значение площади экспрессии Claudin 10 в клеточной культуре atopического дерматита составило $15,4 \pm 0,95$, что было в 0,7 раз меньше, чем в культуре фибробластов кожи человека. Уровень экспрессии оклюдина в культуре клеток atopического дерматита был снижен в 4 раза по сравнению с уровнем экспрессии этого маркера в культуре фибробластов кожи человека. Достоверного снижения уровня E-кадгерина нами выявлено не было.

Выводы

Было установлено, что уровни экспрессии молекул окклюдина и клаудина-10 достоверно снижены по сравнению с уровнем экспрессии этих же маркеров в клеточной культуре фибробластов, что свидетельствует о снижении уровня плотных контактов в клетках при atopическом дерматите. Нами не было получено различий в исследуемых культурах по уровню экспрессии E-кадгерина, представляющего собой клеточный адгезионный белок. Таким образом, можно сделать вывод о том, что при atopическом дерматите происходит сбой в эпителиальной дифференцировке, что впоследствии приводит к такому патологическому состоянию, как atopический дерматит.

ДНК-АПТАМЕРЫ К PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА *

DNA APTAMERS TO HUMAN PRIMPOL

Я. Г. Калюжная, К. А. Бондаренко, Е. О. Болдинова, А. В. Макарова

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Ya. G. Kaluzhnaya, K. A. Bondarenko, E. O. Boldinova, A. V. Makarova

National research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

E-mail: amakarova-img@yandex.ru

Аннотация

Получены и охарактеризованы *in vitro* девять ДНК-аптамеров к PrimPol человека, ингибирующие ДНК-полимеразную и праймазную активности. Четыре ДНК-аптамера специфически ингибировали ДНК-праймазную активность.

Abstract

Nine DNA aptamers to human PrimPol were obtained and characterized *in vitro*. All aptamers inhibited DNA polymerase and primase DNA-activities. Four DNA aptamers specifically inhibited DNA primase activity.

DNA primase and human DNA polymerase PrimPol re-initiates replication after various DNA lesions using primase activity. Many chemotherapy drugs block the rapid division of tumor cells through DNA damage. Inhibiting PrimPol activity can increase the effectiveness of chemotherapy. One way to inhibit enzyme activity is to use aptamers. Aptamers are oligonucleotide RNA or DNA molecules selected from RNA/DNA libraries and specifically interact with target molecules.

Using the SELEX method, 9 inhibitory DNA aptamers to human PrimPol were obtained. In vitro testing of the inhibition of DNA polymerase and DNA primase activities of PrimPol by the obtained DNA aptamers was carried out. Five aptamers inhibited the DNA polymerase and DNA primase activities of the enzyme, while four aptamers selectively inhibited the primase activity. The resulting aptamers did not inhibit human DNA polymerases Pol eta, Pol iota, Pol kappa, Pol beta, which indicates their specificity.

© Я. Г. Калюжная, К. А. Бондаренко, Е. О. Болдинова, А. В. Макарова, 2020

* Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-04-00777.

АССОЦИАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА SIRT1rs12778366 С ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ

ASSOCIATION OF SIRT1rs12778366 GENE GENETIC POLYMORPHISM WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Н. С. Карпова¹, О. П. Дмитренко¹, М. К. Нурбеков¹,
О. И. Абрамова², Л. К. Мошетьова², К. И. Туркина²

¹*Научно-исследовательский институт общей патологии
и патофизиологии, Москва*

²*Российская медицинская академия непрерывного
профессионального образования, Москва*

N. S. Karpova¹, O. P. Dmitrenko¹, M. K. Nurbekov¹,
O. I. Abramova², L. K. Moshetova², K. I. Turkina²

¹*Research Institute of Pathology and Pathophysiology, Moscow*

²*Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow*

E-mail: nataliakarpova.sp@gmail.com

Аннотация

В исследовании выявлены особенности в распределении частот аллелей и генотипов анализируемого полиморфного локуса rs12778366 в гене SIRT1, ассоциированные с риском развития ВМД. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения ассоциации полиморфного локуса rs12778366 с ВМД в российской популяции.

Abstract

There were peculiar features of the alleles and genotypes frequency and distribution in the analyzed polymorphic locus rs12778366 in the SIRT1 gene, which are associated with the risk of AMD development. The data obtained indicate the need for further study of the association of the polymorphic locus rs12778366 with AMD in representatives of the Russian Federation

Наиболее распространенной причиной слепоты и слабовидения у пожилых людей является возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — сложное

многофакторное состояние, включающее в себя множество генетических, экологических и конституциональных факторов и характеризующееся поражением макулярной зоны сетчатки. Причины возникновения и механизм развития этого заболевания до настоящего времени в полной мере не выяснены, а изучение молекулярных механизмов развития ВМД затруднено из-за отсутствия *in vitro* моделей, воспроизводящих особенности данного заболевания, а имеющиеся модели *in vivo* не позволяют точно представить характеристики ВМД [1].

Полиморфные варианты гена SIRT1, расположенного в области q21.3 10-й хромосомы и являющегося важным геном-кандидатом в иницировании развития ассоциированных с возрастом заболеваний, мало изучены. Предварительный анализ, исходя из подхода к генетическому картированию, основанному на выборе гена-кандидата, позволил нам предположить, что полиморфизм гена SIRT1 (rs12778366) может быть важной детерминантой развития ВМД. Z.Chen и др. (2017) показали, что rs12778366 SIRT1 ассоциирован с ВМД у гомозиготных носителей минорного аллеля С в китайской популяции Хань, Liutkeviciene R. и другие исследователи выявили близкую к статистически значимой ассоциацию rs12778366 с развитием ВМД в литовской популяции по аллелю С [2, 3]. Поэтому целью исследования было изучение частотных характеристик генотипов и аллелей SNP полиморфизма rs12778366 в гене SIRT1 и выявление взаимосвязи с риском развития ВМД в российской популяции.

В исследовании использовалась геномная ДНК, выделенная методом фенол-хлороформной экстракции из образцов буккального эпителия 28 пациентов с ВМД и 22 человек без ВМД. Генотипирование полиморфного локуса rs12778366 гена SIRT1 проводили методом ПЦР РВ с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов.

По результатам исследования выявлена значительная ассоциация полиморфного локуса rs12778366 в гене SIRT1 с заболеванием у гомозиготных носителей аллеля Т. Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения ассоциации полиморфизма rs12778366 в гене SIRT1 с ВМД с параллельным исследованием других генетических вариаций гена SIRT1, которые также могут оказывать влияние на развитие данной патологии.

Литература

1. Lim L. S., Mitchell P., Seddon J. M., Holz F. G., Wong T. Y. Age-related macular degeneration // Lancet. 2012. Vol. 379 (9827). P. 1728–1738. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.

2. Chen Z., Zhai Y., Zhang W., Teng Y., Yao K.. Single Nucleotide Polymorphisms of the Sirtuin 1 (SIRT1) Gene are Associated With age-Related Macular Degeneration in Chinese Han Individuals: A Case-Control Pilot Study // *Medicine (Baltimore)*. 2015. Vol. 94. e2238.

3. Liutkeviciene R., Vilkeviciute A., Kriauciuniene L. and Deltuva V. P. SIRT1 rs12778366, FGFR2rs2981582, STAT3rs744166, LIPCrs10468017, rs493258 and LPLrs12678919 genotypes and haplotype evaluation in patients with age-related macular degeneration // *Gene*. 2019. Vol. 686. P.8–15.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *MC1R* ДЛЯ ОСОБЕЙ ВИДА *SUS SCROFA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP ***ANALYSIS OF *MC1R* GENE POLYMORPHISM OF *SUS SCROFA* SPECIES WITH KASP TECHNOLOGIES**

В. Н. Кипень ¹, Е. В. Снытков ², А. А. Кривенко ³, М. М. Патрин ³

¹*Институт Генетики и Цитологии НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Международный государственный институт
им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь*

³*ООО «МАКСИМ МЕДИКАЛ», пос. Архангельское*

V. N. Kipen ¹, E. V. Snytkov ², A. A. Krivenko ³, M. M. Patrin ³

¹*Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk*

²*International Sakharov Environmental Institute
of Belarusian State University, Minsk*

³*ООО «MAXIM MEDICAL», Arkhangelskoe*

E-mail: v.kipen@igc.by

Аннотация

Проведены тесты на специфичность, чувствительность и робастность для генотипирования полиморфизма с.367G>А гена *MC1R* с использованием технологии конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP).

Abstract

The paper presents the results of tests for specificity, sensitivity and robustness for genotyping the c.367G>A polymorphism of the *MC1R* gene using the technology of kompetitive allele-specific PCR (KASP).

© В. Н. Кипень, Е. В. Снытков, А. А. Кривенко, М. М. Патрин, 2020

* Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «МАКСИМ МЕДИКАЛ» (пос. Архангельское, Московская обл., Российская Федерация, e-mail: max@maxmedikal.com).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение

Задача по дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domesticus*) может быть решена с использованием анализа полиморфных вариантов генов *MC1R*, *NR6A1* и *HEPH*. При использовании метода ПЦР-ПДРФ для получения результата требуется 6–7 часов. Многостадийность процесса сопряжена к тому же с аккумуляцией ошибок. Этих недостатков лишена технология KASP (Kompetitive allele specific PCR, LGC Biosearch Technologies) — необходимое время получения итогового результата генотипирования в этом случае составляет до 2,5 часов в одну стадию, при проведении дополнительной процедуры плавления ампликона общее время анализа составит не более 3,5 часа.

Цель исследования — оценить применимость технологии KASP для генотипирования полиморфизма с.367G>A (*MC1R*, Chr.6:g.181818G>A) на биологических образцах особей домашней свиньи (DS) и дикого кабана (WB).

Материалы и методы

Определение генотипа осуществляли с использованием технологии, основанной на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP). Генотипирование проводили с использованием KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) и KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания; ООО «Максим Медикал», РФ) в двукратной повторности. ПЦР проводили в объеме 10 мкл в термоциклире CFX96 (Bio-Rad, США) согласно имеющимся рекомендациям по KASP.

Результаты теста на специфичность рассчитывались как FR (false rate) в % = (число несовпадений генотипов для технологий ПЦР-ПДРФ и KASP) / (число проведенных реакций ПЦР) · 100. Чувствительность технологии KASP применимо к исследуемым полиморфным вариантам выражена в виде предела концентрации ДНК (limit of detection, LOD) для корректного обнаружения генотипа. Для определения нижнего предела детектируемого количества генетического материала в реакции ПЦР была использована серия разведений ДНК для 9 образцов с известным генотипом. Диапазон тестируемого количества ДНК в реакции ПЦР составил 1,0–50,0 нг/реакцию — концентрации 1,0 нг/мкл, 2,0 нг/мкл, 5,0 нг/мкл, 10 нг/мкл, 20 нг/мкл, 50 нг/мкл. В тесте на робастность (устойчивость) использовали различный объем ПЦР-смеси (7,5 мкл, 10,0 мкл и 12,5 мкл) и 2 протокола ПЦР, рекомендованных LGC Biosearch Technologies, с температурой отжига праймеров 57,0 °C — «65–57 °C touchdown protocol» и «2-Step 57 °C protocol»*.

* URL: <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/KASP-thermal-cycling-conditions-all-protocols.pdf>

Основные результаты

Для полиморфизма с.367G>A (*MC1R*) генотип AA был выявлен в 56,25 % случаев (DS — 54), генотип AG — в 16,67 % (DS — 5, WB — 11), GG — 27,08 % (DS — 10, WB — 16), см. рисунок. Специфичность составила 100 % — результаты генотипирования с использованием технологии ПЦР-ПДРФ и KASP совпали полностью. Минимальное достаточное количество ДНК для корректного определения генотипа составило не менее 1,0 нг/реакцию при 42 циклах амплификации, при 36 циклах амплификации (т. е. при использовании только основного протокола, без доамплификации по 3 цикла) LOD = 5,0 нг/реакцию. В тесте на робастность (устойчивость) при использовании объема ПЦР-смеси 7,5, 10,0 или 12,5 мкл для двух протоколов ПЦР «65–57 °C touchdown protocol» и «2-Step 57 °C protocol» случаи некорректного определения генотипа или отсутствие продуктов ПЦР не выявлены. Таким образом, для технологии KASP при генотипировании по полиморфизму с.367G>A (*MC1R*) показана высокая робастность.

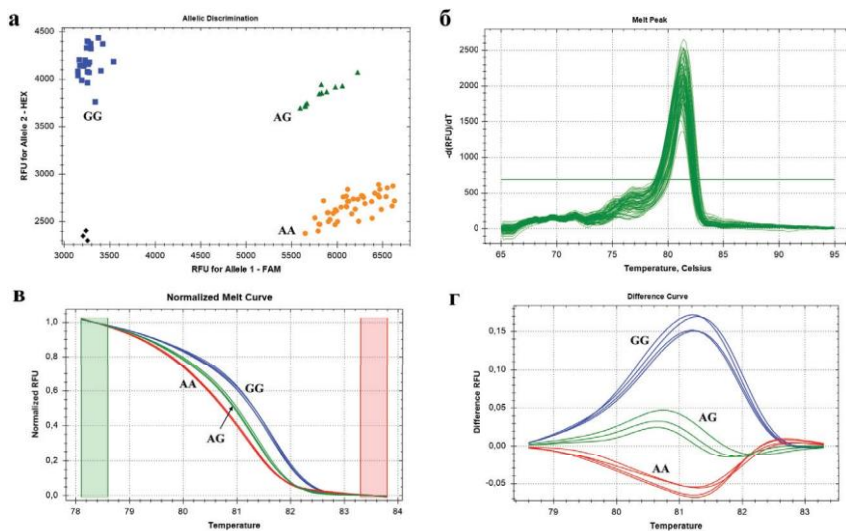


График аллельной дискриминации результатов KASP (а); стадии плавления ампликона (характеризует относительную специфичность ПЦР) (б); результаты HRM-анализа (в, г)

Выводы

Для технологии генотипирования KASP при генотипировании полиморфизма с.367G>A (*MC1R*) определены высокие показателями специфичности, чувствительности и робастности. На основании полученных результатов может быть разработана тест-система для дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domesticus*) с использованием технологии KASP.

**IN SILICO АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА H3GA0051811 ГЕНА HEPH
ДЛЯ ЖИВОТНЫХ ВИДА SUS SCROFA**

*IN SILICO ANALYSIS OF H3GA0051811 POLYMORPHISM
IN HEPH GENE FOR ANIMAL SPECIES SUS SCROFA*

В. Н. Кипень¹, Е. В. Снытков², А. А. Кривенко³, М. М. Патрин³

¹*Институт Генетики и Цитологии НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Международный государственный институт
им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь*

³*ООО «МАКСИМ МЕДИКАЛ», пос. Архангельское*

V. N. Kipen¹, E. V. Snytkov², A. A. Krivenko³, M. M. Patrin³

¹*Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk*

²*International Sakharov Environmental Institute
of Belarusian State University, Minsk*

³*ООО «MAXIM MEDICAL», Arkhangelskoe*

E-mail: v.kipen@igc.by

Аннотация

С использованием биоинформатических подходов доказан высокий дифференцирующий потенциал полиморфизма H3GA0051811 (*HEPH*) для различения особей дикого кабана и домашней свиньи.

Abstract

Using bioinformatics applications, we have proven the high potential of the H3GA0051811 (*HEPH*) polymorphism for differentiation between wild boar and domestic pig.

Введение

В ряде работ дискутировались положительные стороны и недостатки ряда подходов, направленных на решение задачи по дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*).

© В. Н. Кипень, Е. В. Снытков, А. А. Кривенко, М. М. Патрин, 2020

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

На основании пилотного биоинформатического анализа в гене *HEPH* нами были выявлены дополнительные полиморфные варианты с предположительно высоким дифференцирующим потенциалом. Однако молекулярно-генетический анализ некоторых из них невозможен классическим методом ПЦР-ПДРФ. Данное затруднение может быть решено с использованием технологии KASP (Kompetitive allele specific PCR, LGC Biosearch Technologies), с применением которой возможны разработка и создание полуколичественных тест-систем с использованием приборов Real-time PCR в одну стадию.

Цель и задачи

Оценить частоту распространенности полиморфизма H3GA0051811 (ген *HEPH*) среди особей вида *Sus scrofa* с использованием методов биоинформатики (определение генотипа *in silico*) на основании данных SRA *. На основании полученных результатов охарактеризовать предсказательный потенциал данного полиморфизма для дифференциации особей *Sus scrofa scrofa* (дикий кабан) и *Sus scrofa domesticus* (домашняя свинья).

Материалы и методы

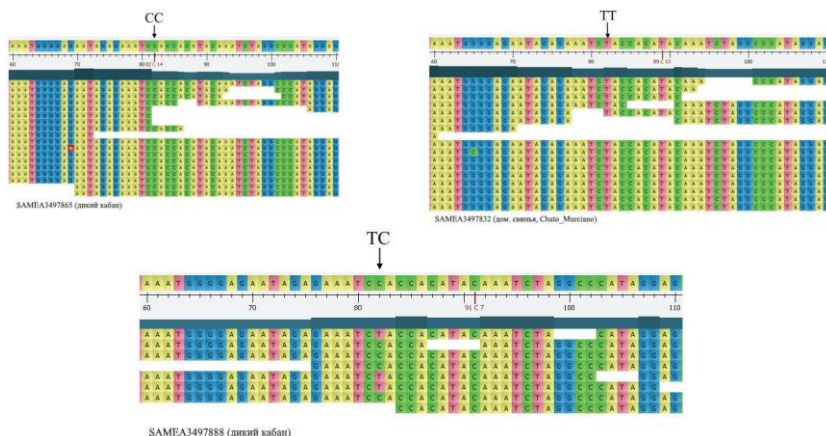
В NCBI (National Center for Biotechnology Information) имеются геномы в формате SRA (проанализировано 32 проекта) для 406 особей вида *Sus scrofa*: PRJEB35180, PRJEB37956, PRJEB9326, PRJEB9922, PRJNA186497, PRJNA213179, PRJNA221763, PRJNA231897, PRJNA238851, PRJNA239399, PRJNA255085, PRJNA260763, PRJNA281548, PRJNA305081, PRJNA309108, PRJNA314580, PRJNA320525, PRJNA322309, PRJNA343658, PRJNA354435, PRJNA378496, PRJNA418771, PRJNA478804, PRJNA485589, PRJNA488327, PRJNA506339, PRJNA507853, PRJNA524263, PRJNA550237, PRJNA553106, PRJNA622908 и PRJNA626370. Генотипы *in silico* для животных определяли с использованием онлайн-алгоритма SRA-Blast (файлы в формате *.sam) и программы Unipro UGENE v.35.1. Определение генотипа для полиморфизма H3GA0051811 (ген *HEPH*) с использованием алгоритма BLAST было проведено для 283 особей вида *Sus scrofa*, с покрытием в интересующем полиморфизме $\geq 5x$. Для автоматизации процесса поиска, скачивания файлов в формате *.sam, а также пакетного определения генотипа для первичного анализа применяли скрипт на языке Python 3 с использованием дистрибутива языков программирования Anaconda. Дифференцирующий потенциал полиморфизма определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0. При наличии нижней границы асимптотического 95 % доверительного ин-

* URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>.

тервала более 0,8 для параметра AUC (площадь под кривой) полиморфизм позиционировался как генетический маркер с высоким дифференцирующим потенциалом.

Основные результаты

Для полиморфизма H3GA0051811 (ген *HEPH*) для 7 (1,72 %) животных вида *Sus scrofa* был выявлен генотип CC, для 2 (0,49 %) животных — генотип CT, для 397 (97,79 %) животных — генотип TT.



Полиморфизм H3GA0051811 (ген *HEPH*) расположен на X-хромосоме. В сборке генома вида *Sus scrofa* — Sscrofa11.1 (RefSeq GCF_000003025.6) от 2017/02/07 — хромосомная позиция полиморфизма H3GA0051811 — Chr.X: g.52331447T>C. Данный полиморфизм находится в непосредственной близости от полиморфизма H3GA0051814 (ген *HEPH*) — Chr.X: g.53901464T>C, — дифференцирующий потенциал которого был продемонстрирован нами ранее. Расстояние между полиморфизмами оценивается в 1 570 017 п. н., они расположены в пределах одного гена *HEPH* (*hephaestin*, NCBI Gene ID: 100512938) и, соответственно, наследуются совместно — вероятность кроссинговера можно оценить предположительно в 1,5 %.

По результатам ROC-анализа для определения дифференцирующего потенциала полиморфизма H3GA0051811 (ген *HEPH*) значение параметра AUC = 0,995 (95 % ДИ = [0,986–1,0]).

Выводы

Таким образом, по результатам биоинформатического и статистического анализа показано, что для полиморфизма H3GA0051811 (ген *HEPH*) выявлен значительный дифференцирующий потенциал для различения особей *Sus scrofa scrofa* (дикий кабан) и *Sus scrofa domesticus* (домашняя свинья) между собой. Значимость данного полиморфизма для решения задачи дифференциации в пределах вида *Sus scrofa* сопоставима с потенциалом полиморфизма H3GA0051814 (ген *HEPH*). С использованием технологии KASP будет проведено генотипирование особей вида *Sus scrofa* для проверки данного заключения на практике (*in vitro*).

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПИДА А И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
СВОЙСТВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА RICKETTSIA SIBIRICA****STUDY OF THE STRUCTURE OF LIPID A AND PRO-INFLAMMATORY
PROPERTIES OF LIPOPOLYSACCHARIDE OF RICKETTSIA SIBIRICA**

А. В. Кондратьев, А. В. Костарной, П. Г. Ганчева,
М. В. Соколова, П. В. Метальников

*Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва*

A. V. Kondratiev, A. V. Kostarnoy, P. G. Gancheva,
M. V. Sokolova, P. V. Metalnikov

*The National Research Center for Epidemiology and Microbiology
named after N. F. Gamaleya, Moscow*

E-mail: raykes4@gmail.com

Аннотация

Впервые определена структура липида А *Rickettsia sibirica* методами масс-спектрометрии. Изучена способность липополисахарида *Rickettsia sibirica* индуцировать провоспалительный ответ в культуре эндотелиальных клеток мозга. Показано, что структура липида А, в частности распределение ацильных радикалов, схожа с классической структурой липида А *E. coli*, что проявляется в практически одинаковой способности ЛПС *Rickettsia sibirica* и *E. coli* индуцировать секрецию медиаторов воспаления.

Abstract

The structure of lipid A of *Rickettsia sibirica* was determined for the first time via mass spectrometry. The ability of *Rickettsia sibirica* lipopolysaccharide to induce a pro-inflammatory response in a culture of brain endothelial cells was evaluated. It has been shown that the structure of lipid A, in particular, the distribution of acyl radicals, is similar to the classical structure of lipid A in *E. coli*: both LPS from *Rickettsia sibirica* and *E. coli* have an equal properties to induce the secretion of inflammatory mediators.

Rickettsia sibirica относится к риккетсиям группы клещевых пятнистых

лихорадок (КПЛ) и является возбудителем сибирского клещевого риккетсиоза (сибирского клещевого тифа). В основе патогенеза риккетсиозов КПЛ лежит паразитирование риккетсий в эндотелии сосудов с развитием воспалительных изменений. Бактериальный липополисахарид (ЛПС) — один из факторов патогенности *Rickettsia sibirica*. К настоящему времени считается доказанным, что биологическая активность бактериальных липополисахаридов обусловлена структурой липида А.

Цель работы — изучить структуру липида А и способность липополисахарида *Rickettsia sibirica* индуцировать провоспалительный ответ по сравнению с липополисахаридом *E. coli*. Структура и степень ацилирования липида А была определена методом MALDI-масс-спектрометрии. В дополнительной серии экспериментов структура жирнокислотных остатков была уточнена с использованием газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Полученные данные выявили значительное структурное сходство расшифрованной структурой липида А *Rickettsia sibirica* с классической структурой липида А энтеробактерий *E. coli*.

Учитывая тропность *Rickettsia sibirica* к эндотелию, в качестве модельной системы *in vitro* для изучения провоспалительной активности ЛПС была выбрана культура мозговых эндотелиальных клеток. После стимуляции ЛПС *Rickettsia sibirica* и ЛПС *E. coli* (Sigma), в супернатантах была определена концентрация цитокинов, хемокинов и факторов роста с помощью мультиплексного анализа. Зафиксировано увеличение экспрессии следующих цитокинов, хемокинов и факторов роста в ответ на добавление ЛПС *Rickettsia sibirica*: IL-6, TNF- α , IL-9, IL-1 α , LIX, IP-10, KC, MCP-1, MIP-2, RANTES, G-CSF. Уровень секреции указанных медиаторов воспаления, индуцированный ЛПС *Rickettsia sibirica* статистически значимо не отличался от уровня секреции, индуцированном ЛПС *E. coli*. Полученные данные коррелируют с результатами анализа структуры липида А, показавшего высокую степень сходства липида А *Rickettsia sibirica* и *E. coli*.

**СИНИЙ ХРОМОБЕЛОК ИЗ МЕДУЗЫ *RHIZOSTOMA PULMO*:
ОЧИСТКА, СВОЙСТВА И ПОДБОР УСЛОВИЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ*****THE BLUE CHROMOPROTEIN FROM JELLYFISH *RHIZOSTOMA
PULMO*: PURIFICATION, PROPERTIES AND CONDITIONS FOR
CRYSTALLIZATION**

Е. С. Корунова^{1,2}, А. Ю. Гороховатский¹, Т. В. Чепурных¹,
Р. Х. Зиганшин¹, А. С. Царькова¹, Ю. А. Мокрушина¹, И. В. Ямпольский¹

¹Институт биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E. S. Korunova^{1,2}, A. u. Gorokhovatsky¹, T. V. Chepurnykh¹,
R. Kh. Ziganshin¹, Yu. A. Mokrushina¹, A. S. Tsarkova¹, I. V. Yampolsky¹

¹*Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow*

²*Lomonosov Moscow State University*

E-mail: elizavetakorunova8@gmail.com

Аннотация

Синяя окраска медузы *Rhizostoma pulmo* обусловлена хромобелком rpulFKz1. Хромобелок имеет спектр поглощения с максимумами 420, 588 и 624 нм. Электрофоретическая подвижность выделенного белка в денатурирующих условиях соответствует 32 кДа. Разработан метод очистки белка и подобраны условия кристаллизации.

Abstract

The blue color of jellyfish *Rhizostoma pulmo* is caused by a chromoprotein rpulFKz1 with the maxima at 420, 588 and 624 nm of an absorption spectrum. The electrophoretic mobility of the purified unfolded protein corresponded to 32 kDa. A method for purification and crystallization of rpulFKz1 from *R. pulmo* was developed.

© Е. С. Корунова, А. Ю. Гороховатский, Т. В. Чепурных, Р. Х. Зиганшин,
А. С. Царькова, Ю. А. Мокрушина, И. В. Ямпольский, 2020

* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2605.2020.4.

Морские беспозвоночные демонстрируют широкий спектр окрасок, о химии которых до последнего времени было известно мало. Часто окраска обуславливается хромобелком — комплексом апо-белка и связанного с ним кофактора. Ранее было показано, что синяя окраска медузы *Rhizostoma pulmo* обусловлена хромобелком grulFKz1. Последовательность этого белка имеет гомологию с цистеин-обогащенным доменом Frizzled и с Kringle-доменом^{*}. Однако природа хромопротеина остается неизвестной.

Целью данной работы явилось получение grulFKz1 в чистом виде, пригодном для структурных исследований, в частности для рентгеноструктурного анализа. Была разработана методика очистки grulFKz1 из природного источника, медузы *R. pulmo*, включающая в себя ступенчатое осаждение сульфатом аммония, ионообменную и гель-фильтрационную хроматографии. Хромобелок характеризуется спектром поглощения с максимумами при 420, 588 и 624 нм. Электрофоретическая подвижность выделенного белка в денатурирующих условиях соответствует 32 kDa. Обработка в геле белковой полосы grulFKz1 периодатом и реактивом Шиффа дает характерное окрашивание и указывает на то, что этот белок является гликопротеином. Подвижность grulFKz1 в условиях гель-фильтрации соответствует динамическому равновесию между мономерной и димерной формами хромобелка, с преобладанием димерной формы. Плавление grulFKz1 в различных буферных растворах в присутствии флуоресцентного красителя Sypro Orange позволило определить диапазон условий, обеспечивающих наибольшую стабильность белка. Найденные условия были использованы при кристаллизации белка grulFKz1.

^{*} Bulina M. E., Lukyanov K. A., Yampolsky I. V., Chudakov D. M., Staroverov D. B., Shcheglov A. S., Gurskaya N. G., Lukyanov S. New Class of Blue Animal Pigments Based on Frizzled and Kringle Protein Domains // The Journal of Biological Chemistry. 2004, Vol. 279 (№ 45). P.43367–43370.

**ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ PАРP1 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ
В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ***

**INFLUENCE OF PАРP1 LEVEL ON BASE EXCISION REPAIR
EFFICIENCY IN HUMAN CELLS**

А. С. Кочеткова ^{1,2}, Е. С. Ильина ^{1,2}, С. Н. Ходырева ¹, О. И. Лаврик ^{1,2}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Новосибирский государственный университет*

A. S. Kochetkova ^{1,2}, E. S. Ilina ^{1,2}, S. N. Khodyreva ¹, O. I. Lavric ^{1,2}

¹ *Institute of Chemical Biology
and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*
² *Novosibirsk State University*

E-mail: Kochetkovaalina96@gmail.com

Аннотация

Эксцизионная репарация оснований (ЭРО) — механизм, направленный на исправление одной из самых многочисленных групп повреждений структуры ДНК — модифицированных азотистых оснований. Важным регуляторным белком ЭРО является поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PАРP1), функция которой заключается в поиске повреждений ДНК и иницировании сборки комплекса для их устранения. Для изучения роли PАРP1 в регуляции ЭРО на экстрактах РНК и белков из клеточных линий НЕК-293Т с различным уровнем PАРP1 мы исследовали зависимость экспрессии генов, кодирующих ряд ключевых белков ЭРО от экспрессии гена PАРP1 и сравнили эффективности функционирования этих белков на ключевых стадиях ЭРО.

Abstract

Base excision repair (BER) is a cellular mechanism aimed at correcting one of the most numerous groups of DNA structure damage — modified nucleobases. An important regulatory BER protein is a poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PАРP1), its function is to search for DNA lesions and initiate the assembly of a complex for their correction. We used RNA

and protein extracts from HEK-293T cell lines with different PARP1 levels for research the dependence of expression of genes encoding some BER proteins on PARP1 expression and comparing these proteins efficiency on key BER steps. The study will be necessary to understanding of the crucial role of PARP1 in BER.

ДНК незаменима и уникальна, сохранение стабильности ее структуры имеет важное значение для жизнедеятельности организма и предотвращения развития различных заболеваний, в том числе онкологических. За поддержание целостности генома отвечают системы репарации, обеспечивающие исправление различных повреждений в структуре ДНК. Система эксцизионной репарации оснований (ЭРО) исправляет наиболее распространенные повреждения структуры ДНК — химически модифицированные азотистые основания. Считается, что для увеличения эффективности и ускорения репарационного процесса необходимы белки-регуляторы. В случае ЭРО одним из таких белков является поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1), которая выступает в роли «сенсора» повреждений и инициирует запуск репаративных процессов в клетке путем привлечения белков-участников репарации к сайту повреждения посредством посттрансляционной модификации ядерных белков поли(АДФ)рибозой (PAR).

В данной работе мы изучали возможное влияние изменения уровня PARP1 в клетке на координацию работы и активность некоторых белков ЭРО, а также на экспрессию генов, которые их кодируют. В связи с этим нами были выбраны клеточные линии с различным содержанием PARP1: HEK-293T и HEK-293T-P1⁻ (со сниженным содержанием PARP1); HEK-293FT и HEK-293FT-P1^{-/-} (с нокаутом по PARP1), из которых выделяли тотальную РНК и получали белковые экстракты. Мы также поставили задачу оценить влияние окислительного стресса на статус ЭРО. Для этого клетки HEK-293T и HEK-293T-P1⁻ помещали в среду с 1 мМ H₂O₂ и через 2 ч и 18 ч клетки собирали и выделяли экстракты белков.

В клетках с нокаутом и нокаутом по PARP1 по результатам ОТ-кПЦР для генов *PARP1*, *PARP2*, *UNG*, *APEX1*, *Polb* было показано изменение в уровне мРНК этих генов. С помощью функциональных тестов с использованием ³²P-меченых ДНК-дуплексов, моделирующих различные интермедиаты ЭРО, и белковых экстрактов с различным уровнем PARP1 показано влияние PARP1 на эффективность синтеза PAR, удаление урацила, процессинг апуринового/апириμιдинового сайта и ДНК-полимеразную активность.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХЛОРИДА КАДМИЯ НА ФРАГМЕНТАЦИЮ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫС

ESTIMATION OF THE INFLUENCE OF CADMIUM CHLORIDE ON DNA FRAGMENTATION OF RAT LEUKOCYTES

Е. Р. Кудояров, Д. Д. Каримов, Д. О. Каримов,
Н. Ю. Хуснутдинова, С. С. Байгильдин, А. С. Фазлыева

Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека

*E. R. Kudoyarov, D. D. Karimov, D. O. Karimov,
N. Yu. Khusnutdinova, S. S. Baigil'din, A. S. Fazlyeva*

Ufa Scientific Research Institute of Occupational Health and Human Ecology

E-mail: e.kudoyarov@yandex.ru

Аннотация

Пероральное введение хлорида кадмия в организм крыс привело к статистически значимому повышению уровня фрагментации ДНК в лейкоцитах крови по сравнению с контрольными животными.

Abstract

Oral administration of cadmium chloride to rats led to a statistically significant increase in the level of DNA fragmentation in blood leukocytes, compared with control animals.

Кадмий и его соединения относятся к одной из 10 групп химических веществ, вызывающих озабоченность в области общественного здравоохранения по данным Всемирной организации здравоохранения. Главной областью применения кадмия являются химические источники тока, которые имеют широкое практическое применение. Это обуславливает распространение кадмия в антропогенных ландшафтах и высокую вероятность кумуляции в продуктах питания. Кадмий является токсичным соединением с доказанной канцерогенностью (относится к I группе веществ по классификации МАИР).

Цель исследования — оценить влияние перорального введения раствора хлорида кадмия на фрагментацию ДНК лейкоцитов аутобредных белых крыс. Работы по содержанию и затравке крыс проводили с соблюдением общепринятых этических правил и принципов, изложенных в рекомендациях комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Министерстве здравоохранения Российской Федерации, рекомендациях ВОЗ и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123; 1986 г.).

Экспериментальное научное исследование выполнено на 15 крысах-самцах массой 220–240 г. Животным из контрольной группы ($n = 5$) вводили дистиллированную воду *per os*. Остальные животные ($n = 10$) были распределены по 5 особей на 2 группы в соответствии с полученной ими однократной дозой хлорида кадмия (1000 или 10000 мг/кг). Выведение животных из эксперимента с последующим отбором крови проведено на 5-е сутки (через 96 часов). После этого из 2 мл крови были выделены лейкоциты центрифугированием в градиенте фиколла (5 мин, 400 g). Для исследования фрагментации ДНК-клеток использовали метод электрофореза одиночных клеток в агарозном геле (ДНК-«комет») в модификации Singh и др. (1988). Микропрепараты ДНК-«комет» окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green I, исследовали под микроскопом Zeiss Axio Imager.D2 (увеличение 100x) и фотографировали на камеру AxioCam MRc5. Определение содержания ДНК в хвосте комет (%) проводили в программе ImageJ 1.48 (Wayne Rasband). Для сравнения групп рассчитывали H -критерий Краскела — Уоллиса и U -критерий Манна — Уитни в программе SPSS Statistics 21.

Доли ДНК в хвосте «комет» во всех трех группах значительно различались друг от друга ($H = 30,592$, $p < 0,001$). Процентная доля ДНК в хвосте «комет» контрольных животных составила $3,41 \pm 0,36$ %. После однократной затравки раствором хлорида кадмия в дозе 1000 мг/кг доля ДНК в хвосте «комет» равна $6,13 \pm 0,77$ %, что выше, чем в контрольной группе ($U = 7353$, $p = 0,004$). После введения крысам хлорида кадмия в дозе 10000 мг/кг доля ДНК в хвосте «комет» равна $7,77 \pm 0,62$ % (выше значений в контрольной группе, $U = 10514$, $p < 0,001$). Различия между группами животных, получивших хлорид кадмия, по процентной доле ДНК в хвосте «комет» оказались статистически значимыми ($U = 16805$, $p = 0,022$). Средняя доля «комет» с количеством ДНК в хвосте более 10 % у контрольных животных составила 107,2 %, при затравке хлоридом кадмия в дозах 1000 и 10000 мг/кг — 266,3 и 379,1 % соответственно. Таким образом, повышение фрагментации ДНК в лейкоцитах животных на 5-е сутки при однократном поступлении *per os* хлорида кадмия в дозах 1000 и 10000 мг/кг может свидетельствовать о необратимом характере повреждений структуры ДНК.

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ПРОГНОЗА
ПРИ МДС НА ОСНОВЕ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ
В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРАХ**

**TEST-SYSTEM FOR DIAGNOSTICS AND EVALUATION
OF PROGNOSIS AT MDS BASED ON SOMATIC MUTATIONS
IN EPIGENETIC REGULATORS**

Е. Д. Кулаева¹, П. В. Липилкин²

¹*Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону*

²*Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н. И. Пирогова, Москва*

E. D. Kulaeva¹, P. V. Lipilkin²

¹*Southern Federal University, Rostov-on-Don*

²*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

E-mail: ekulaeva@sfedu.ru

Аннотация

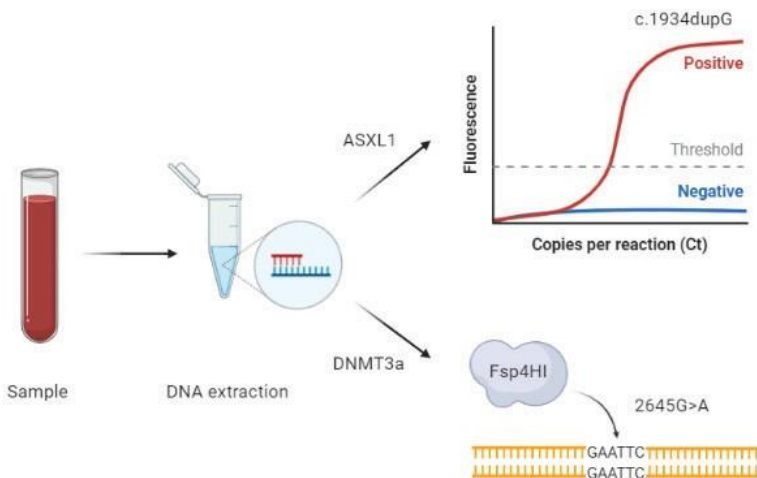
Разработка дизайна тест-системы для диагностики и прогноза МДС на основе анализа распространенных соматических мутаций в генах DNMT3A и ASXL1.

Abstract

Development of a test system design for diagnostics and prognosis of MDS based on analysis of common somatic mutations in DNMT3A and ASXL1 genes.

Миелодиспластический синдром (МДС) — гетерогенная группа клональных заболеваний системы крови, возникающих вследствие мутации гемопоэтической стволовой клетки и характеризующихся высоким риском трансформации в острый лейкоз. Минусом существующих тест-систем для диагностики МДС является отсутствие их явной клинической значимости.

Мы сосредоточились на создании тест-системы на основе соматических мутаций в эпигенетических регуляторах ASXL1 и DNMT3A, для которых уже определена частота встречаемости и прогностическая значимость (см. рисунок).



ASXL1 — белок группы Polycomb, регулирующий деубиквитинирование гистона H2A. Мутации в ASXL1 часто выявляются у пациентов с риском развития МДС и способствуют миелоидной трансформации. В тест-системе будет включена часто встречающаяся соматическая мутация c.1934dupG, анализируемая с помощью RT-PCR.

DNMT3A (ДНК-метилтрансфераза 3A), обеспечивает de novo метилирование. Соматические мутации в DNMT3A регистрируются в 20–30 % случаев МДС и могут быть фактором развития ОМЛ. Одной из самых частых соматических мутаций в данном гене является замена 2645G>A в 23 экзоне, приводящая к нарушению функции белка, которая будет проанализирована в тест-системе с помощью рестрикционного анализа экзона.

Ожидаемыми результатами работы будет являться создание тест-системы, сочетающей в себе диагностические и прогностические функции при МДС.

ОЦЕНКА УРОВНЯ РАЗЛИЧНЫХ МИКРОРНК НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ МОЛОКА *

THE CONTENT OF MICRO RNA IN DIFFERENT MILK EXOSOME ISOLATION STAGES

А. Е. Кулешова ¹, Л. В. Пурвиньш ², Е. Е. Буркова ¹

¹Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
²Новосибирский государственный университет

A. E. Kuleshova ¹, L. V. Purvinsh ², E. E. Burkova ¹

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
²*Novosibirsk State University*

E-mail: kuleshova@niboch.nsc.ru

Аннотация

Экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию путем переноса нуклеиновых кислот. Экзосомы молока доступны в промышленных масштабах, поэтому они являются перспективными средствами направленной доставки лекарственных препаратов. Определено абсолютное количество 20 различных микроРНК в разных фракциях молока, а также описаны специфические паттерны их экспрессии.

Abstract

Exosomes carry out intercellular communication by transferring nucleic acids. Milk exosomes are available on an industrial scale, so they are promising vehicles for targeted drug delivery. The absolute number of 20 different microRNAs in different milk fractions, including exosomal, was determined, and specific patterns of their expression described.

Экзосомы — нановезикулы, содержащиеся в различных биологических жидкостях и принимающие участие в межклеточной коммуникации. Известно, что экзосомы молока содержат различные нуклеиновые кислоты, в частности микроРНК и мРНК. Среди всех биологических жидкостей, содержащих экзосомы, молоко является единственной, доступной в про-

© А. Е. Кулешова, Л. В. Пурвиньш, Е. Е. Буркова, 2020

* Работа поддержана грантом РФФ 18-74-10055.

мышленных масштабах. В связи с этим экзосомы молока являются перспективными кандидатами для адресной доставки лекарственных препаратов. Анализ нуклеиновых кислот, содержащихся в экзосомах молока, является актуальной задачей.

Для выделения экзосом из молока использовали протокол, который включал в себя несколько стадий центрифугирования, ультрафильтрацию, ультрацентрифугирование и гель-фильтрацию.

Во фракциях молока, полученных на различных этапах выделения экзосом (жир, творожистый осадок, осадок и супернатант после ультрацентрифугирования, препарат после гель-фильтрации) определили абсолютное количество 20 различных микроРНК. Для данных микроРНК определены специфические паттерны относительной экспрессии в каждой из анализируемых фракций.

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ CRISPR РНК
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО
РЕДАКТИРОВАНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СОЧЕТАНИИ
С БЕЛКАМИ CAS9 ПОВЫШЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ***

**EFFECT OF CRISPR RNA CHEMICAL MODIFICATIONS
ON THE EFFICIENCY OF GENOME EDITING SYSTEM AND THEIR USE
IN COMBINATION WITH HIGH-SPECIFIC MUTANT CAS9 PROTEINS**

Н. А. Логвина ¹, Е. А. Хабардина ¹, Д. А. Стеценко ², Т. С. Зацепин ¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Сколково

² Новосибирский государственный университет

N. A. Logvina ¹, E. A. Khabardina ¹, D. A. Stetsenko ², T. S. Zatsepin ¹

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo

² Novosibirsk State University

E-mail: n.logvina@skoltech.ru

Аннотация

Введение химических модификаций РНК для геномного редактирования с помощью белка Cas9 позволяет улучшить характеристики системы, что необходимо для последующего применения в биомедицине. Новые модификации фосфатных остатков обладают меньшей токсичностью, повышают стабильность РНК и эффективность разрезания ДНК комплексом CRISPR-Cas9. Производительность комплексов модифицированных РНК с высокоспецифичными белками HiFi и sniper Cas9 отличается от комплексов с белком дикого типа благодаря интерференции между изменением свойств РНК и влиянием аминокислотных замен на конформационные переходы в комплексе.

Abstract

The use of chemical modifications of RNA for Cas9-mediated genome editing improves the characteristics of the system, which is necessary for subsequent use in biomedicine. New modifications of phosphate residues are less toxic, increase the stability of RNA and the efficiency of DNA cleavage by the CRISPR-Cas9 complex. The novel RNA

© Н. А. Логвина, Е. А. Хабардина, Д. А. Стеценко, Т. С. Зацепин, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-04-00298.

modifications studied here affect the performance of the highly specific HiFi and sniper Cas9 proteins due to the interference of their effects on the RNP structure.

Редактирование генома является мощным инструментом как для лечения различных заболеваний, так и для научных исследований. Наиболее популярной системой геномного редактирования сегодня является комплекс CRISPR-Cas9, однако для рутинного использования необходимо повышение специфичности и эффективности системы. Для решения этой проблемы возможно как использование мутантных белков Cas9, обладающих большей специфичностью, так и внесение химических модификаций в химически синтезируемые РНК. Нами предложены и новые, ранее не использовавшиеся для этой цели химические модификации РНК, которые были протестированы в комбинации с уже известными паттернами. Были выявлены участки РНК, внедрение в которые данных модификаций повышает эффективность системы CRISPR-Cas9. Комбинация химически модифицированных РНК с мутантными высокоточными белками Cas9 позволяет повысить не только эффективность, но и точность редактирования генома. Мы впервые проанализировали как «взаимодействуют» мутации в белке с модификациями РНК. Отличия в производительности комплексов Cas9 дикого типа и с белками Hifi¹ или sniper-Cas9² свидетельствуют о том, что эффекты от аминокислотных замен и модификаций в РНК не суммируются, но вызывают сложные изменения в работе комплекса, которые могут быть объяснены изменениями в его структуре.

Литература

1. Vakulskas C. A. et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells // *Nature Medicine*. **2018**. Vol. 24 (8). P. 1216–1224. doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0.
2. Lee J. K. et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity // *Nature Communications*. **2018**. Vol. 9 (1). P. 3048. doi.org/10.1038/s41467-018-05477-x.

**АНАЛИЗ КОДИРУЮЩИХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНА *BRCA1*
В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *****ANALYSIS OF *BRCA1* CODING REGIONS IN BREAST CANCER TUMOR**

Е. А. Луцкая², А. М. Певзнер^{1,2}, Д. С. Долгашева^{1,2},
М. К. Ибрагимова¹, М. М. Цыганов¹

¹ *Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального
исследовательского медицинского центра РАН*
² *Томский государственный университет*

E. A. Lutskaya², A. M. Pevzner^{1,2}, D. S. Dolgasheva^{1,2},
M. K. Ibragimova¹, M. M. Tsyganov¹

¹ *Research Institute of Oncology, Tomsk National Research Medical Center
of the Russian Academy of Sciences*
² *National Research Tomsk State University*

E-mail: lizalutzk@gmail.com

Аннотация

В наших предыдущих исследованиях было показано, что дефицит гена *BRCA1*, обусловленный такими изменениями в опухоли, как низкая экспрессия, наличие делеции и потеря гетерозиготности, может быть связан с эффектом химиотерапии и прогнозом заболевания. Однако даже при отсутствии этих факторов эффективность терапии вариабельна. Определение других маркеров позволит более точно разрабатывать стратегию персонализированного лечения каждого конкретного пациента.

Abstract

In our previous researches it was found that *BRCA1* gene deficiency caused by such factors as low expression levels, gene deletion or loss of heterozygosity may be associated with chemotherapy outcome and disease prognosis. However even in the absence of these factors therapy effectiveness may vary. Recognition of other markers would help develop a strategy for personalized therapy for each patient.

Материал и методы

В исследование было включено 15 больных с люминальным В РМЖ ПА–ПВВ стадии. В качестве материалов были использованы операционные образцы опухолевой и нормальной тканей, из которых выделяли ДНК с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Оценку мутаций гена *BRCA1* в опухоли и крови пациентов проводили при помощи секвенирования на приборе MiSeq™ Sequencing System (Illumina, USA) с использованием панели Accel-Amplicon *BRCA1*, *BRCA2*, and *PALB2* Panel (Swift Biosciences, USA). Подготовка библиотек опухолевой ДНК и ДНК крови пациента производилась при помощи набора Swift Normalase KIT (Swift Biosciences, USA). Обработка данных проводилась с помощью пайплайна GATK, генетические варианты, обнаруженные в образцах опухолевой ткани молочной железы, аннотировали с помощью инструмента ANNOVAR.

Результаты

В результате исследования установлено, что отсутствие соматических мутаций в гене *BRCA1* ассоциировано с хорошим ответом на терапию таксотером в предоперационном периоде. Герминальные мутации *BRCA1*: с.4837A>G (p.Ser1613Gly), с.999T>C (p.Ser333=), с.3548A>G (p.Lys1183Arg), с.3113A>G (p.Glu1038Gly), с.2612C>T (p.Pro871Leu), с.2311T>C (p.Leu771=), с.2082C>T (p.Ser694=) связаны с плохим ответом на НХТ таксотером, при отсутствии этих мутаций у пациентов отмечается эффект более 80 %. Появление пяти новых мутаций *BRCA1* в опухоли под действием НХТ наблюдается у 13 % больных и это сопряжено с плохим ответом на НХТ таксотером. При назначении таксотера имеет смысл учитывать соматические и эти герминальные мутации гена *BRCA1*.

Заключение

Таким образом, более комплексная оценка изменений в гене *BRCA1* поможет в более точном назначении персонализированной химиотерапии, позволит улучшить показатели выживаемости и прогноза заболевания.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСПОРИДИЙ
ГОЛАРКТИЧЕСКОГО ВИДА АМФИПОД *GAMMARUS LACUSTRIS*
ИЗ ВОДОЕМОВ БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА *

GENETIC DIVERSITY OF MICROSPORIDIAN PARASITES
OF A Holarctic AMPHIPOD *GAMMARUS LACUSTRIS*
FROM THE BAIKAL REGION

Е. В. Мадьярова, П. Б. Дроздова, М. Д. Димова, А. Н. Гурков,
К. П. Верещагина, Р. В. Адельшин, М. А. Тимофеев

Иркутский государственный университет

E. V. Madyarova, P. B. Drozdova, M. D. Dimova, A. N. Gurkov,
K. P. Vereshchagina, R. V. Adelshin, M. A. Timofeyev

Irkutsk State University

E-mail: madyarovae@gmail.com

Аннотация

Мы исследовали микроспоридий, паразитирующих на виде амфипод *Gammarus lacustris*, который населяет водоемы байкальского региона (кроме озера Байкал) и другие водоемы Голарктики. Анализ данных секвенирования малой субъединицы рибосомной ДНК (мрДНК) и транскриптомов *Gammarus lacustris* из различных мест обитания показал, что этот вид преимущественно инфицирован представителями рода *Dictyocoela*.

Abstract

The goal of our work was to investigate the microsporidian parasites of a Holarctic amphipod species *Gammarus lacustris* in water bodies in the Lake Baikal region and other water bodies of the Holarctic. With SSU rDNA and transcriptome sequencing data, we found that the genus *Dictyocoela* is dominant in *Gammarus lacustris*.

© Е. В. Мадьярова, П. Б. Дроздова, М. Д. Димова, А. Н. Гурков, К. П. Верещагина, Р. В. Адельшин, М. А. Тимофеев, 2020

* Исследование поддержано совместным грантом РФФИ и ассоциации им. Гельмгольца № 18-44-06201.

Одними из уникальных представителей паразитофауны являются микроспоридии. Микроспоридии — очень разнообразная группа облигатных внутриклеточных эукариотических паразитов, родственных грибам; они инфицируют самые разные виды эукариот, включая некоторых протистов, беспозвоночных и позвоночных животных. На данный момент описано около 190 родов и более 1300 видов микроспоридий, почти половина из которых инфицируют гидробионтов, а около 50 родов — водных членистоногих.

В данной работе мы исследовали генетическое разнообразие микроспоридий вида амфипод *Gammarus lacustris* Sars 1863. Данный вид амфипод распространен в Голарктике и встречается в многочисленных мелководных озерах, окружающих Байкал. В Байкале *G. lacustris* встречается только в нескольких закрытых заливах и сорах. В исследовании использовали *G. lacustris* из разных водоемов: озеро 14 (недалеко от пос. Большие Коты), а также небольшие озера вокруг Байкала, заводь реки Ангары (черта г. Иркутска), оз. Шира (респ. Хакасия), озеро на Тибетском плато и некоторые водоемы европейской части страны (например, Белое море неподалеку от м. Картеш).

Мы использовали нуклеотидные последовательности мсрДНК микроспоридий *G. lacustris*, взятые из NCBI Genbank и полученные в данном исследовании. Также провели поиск всех известных мсрРНК микроспоридий в опубликованных данных высокопроизводительного секвенирования транскриптомов 180 особей *G. lacustris* (60 проб, по три особи на пробу) из озера 14 и 9 особей (три пробы по три особи на пробу) из водоема на Тибетском плато.

Абсолютное большинство последовательностей мсрДНК микроспоридий *G. lacustris* принадлежат к роду *Dictyocoela*. Последовательности *Dictyocoela* были сгруппированы без явной географической привязки; например, некоторые последовательности из озера 14 были почти идентичны последовательности из точки отбора на северо-западе России. Анализ транскриптомных данных показал, что 42 из 60 образцов из озера 14 содержали мсрРНК *Dictyocoela*, что соответствует примерно 33 % распространенности *Dictyocoela* в этой популяции. Аналогичную картину мы наблюдали при анализе транскриптомов *G. lacustris* из водоема на Тибетском плато.

Таким образом, *Dictyocoela* является преобладающим микроспоридиальным паразитом у *G. lacustris* из разных регионов (от Шотландии до Тибета), что может говорить о существовании древней ассоциации между паразитом и хозяином.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ СТОП-ПЕПТИДОМ SECМ
И РИБОСОМОЙ *E. COLI* МЕТОДАМИ
МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

INVESTIGATION OF INTERACTION BETWEEN SECМ STOP PEPTIDE
AND *E. COLI* RIBOSOME BY MD SIMULATION METHODS

Г. И. Макаров, А. В. Шунялов

Южно-Уральский государственный университет, Челябинск

G. I. Makarov, A. V. Shunaylov

South Ural State University, Chelyabinsk

E-mail: makarovgi@susu

Аннотация

Стоп-пептид SecM способен обратимо останавливать трансляцию, связываясь со стенками рибосомного туннеля, что используется для регуляции синтеза транслоказы SecA. Структура образующегося комплекса, предложенная Жангом, содержит существенные ошибки. Мы смоделировали структуру комплекса SecM, хорошо объясняющую роль его критически важных аминокислотных остатков во взаимодействии с рибосомой.

Abstract

SecM stop peptide is able to reversibly arrest translation, binding to the nascent peptide exit tunnel (NPET) walls, what is used to regulate the synthesis of SecA translocase. The structure of the SecM-NPET complex, proposed by Zhang, contains significant incorrectnesses. We have modeled the structure of the SecM-NPET complex, which well explains the role of SecM critical amino acid residues in its interaction with the ribosome.

The nascent peptide exit tunnel (NPET) not only elicits nascent peptide from the ribosome, but also participates in the translation regulation. Some peptides, so-called stop peptides, are able to bind the NPET walls alone or together with cofactors, arresting translation. SecM preceding the SecA translocase code in the mRNA is one of these peptides: under SecA deficiency the arrest of the ribosome by SecM leads to unwinding of the mRNA hairpin hiding the SecA start codon and

SecA synthesis. On the contrary, if SecA is abundant, the arrest of the ribosome by SecM is terminated by binding its N-terminus to the Sec translocon and the subsequent completion of SecM synthesis without initiating SecA translation. It was established that SecM is to contain the sequence F₁₅₀XXXXWIXXXXGIRAGP₁₆₆, where X is a replaceable amino acid residue, to be capable to arrest translation.

Mechanism of translation arrest by SecM was studied by MD simulations and cryoEM. However, studying the structure of a peptide-NPET complex is a complicated problem. Thus, Zhang et al presented the structure of the SecM complex with the *E. coli* ribosome, in which the conformation of the critical GIRAG sequence contains two cis-peptide bonds. Whereupon, it is unlikely that anything in this region of the NPET is able to create such a conformation of the nascent peptide, although the published electron density indicates the general path of the peptide chain. Based on it, we simulated the structure of the SecM complex with the *E. coli* ribosome, which is characterized by stable interactions between the amino acid residues critical to SecM activity and NPET, such as the A₁₆₄ and R₁₆₃ hydrogen bonds with U2585 and C2063 residues, hydrophobic contact of I₁₆₂ and A2062 base, stacking interaction and hydrogen bonds of W₁₅₅ with A789 residue. Thus, the structure simulated by us is consistent with the known experimental data. It can be assumed that these interactions enable SecM to bind strongly to NPET impeding translocation. But the external force pulling the peptide from the NPET is capable of breaking them, thereby translation arrest is reversible.

All the calculations were performed with the Lomonosov supercomputer of Moscow State University using GROMACS 5 and PLUMED 2 packages and parm99sb force field.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МОДИФИКАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
A2503 НА РИБОСОМУ *E. COLI* МЕТОДАМИ
МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ *

INVESTIGATION OF A2503 RESISTANCE MODIFICATION IMPACT
ON THE *E. COLI* RIBOSOME BY MD SIMULATIONS METHOD

Т. М. Макарова

Южно-Уральский государственный университет, Челябинск

T. M. Makarova

South Ural State University, Chelyabinsk

E-mail: makarovatm@susu.ru

Аннотация

Консервативно метилированный остаток m²A2503 23S рРНК бактериальной рибосомы подвергается дополнительному 8-метилованию с помощью метилтрансферазы cfr в ответ на присутствие ряда семейств антибиотиков, вызывая тем самым резистентность типа PhLOPS_a.

Abstract

Conservatively monomethylated m²A2503 residue of 23S rRNA of bacterial ribosome undergoes additional 8-methylation by cfr methyltransferase as a response of presence of certain antibiotics families, inducing PhLOPS_a type resistance.

Antibiotics, which induce the cfr methyltransferase, vary in its precise sites and patterns of binding to the ribosome. This indicates that effect of the modification most likely consists in conformational rearrangements of the binding site than in sterical hindrances or certain bonds disruptions.

In order to investigate long-range effect of the resistance modification on the ribosome, MD simulations of the wildtype ribosome and the ribosome with m²m⁸A2503 were performed.

© Т. М. Макарова, 2020

* All the calculations were performed with the Lomonosov supercomputer of Moscow State University using GROMACS 5 packages and Amber14 force field.

The most immediate effect of the additional methyl group in the A2503 nucleobase was enhanced stacking interaction with its neighbor, G2061, and stabilization of hydrogen bonds with A2062. The A-site of the ribosomal PTC (peptidyl transferase center) demonstrated two different allosterically regulated conformations in our previous investigation by MD simulations: an active (AP) and an inactive (PE) ones. The m^2m^8A2503 modification shifted conformations of certain rRNA residues around the PTC towards the AP state when A-site was in the inactive (PE) state. Thus, m^2m^8A2503 hyper-stabilizes the active conformation of the A-site decreasing therefore the effect of antibiotics.

**ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДА ТИРАМА
НА ГИСТОНОВЫЕ МОДИФИКАЦИИ*****EFFECTS OF THIRAM FUNGICIDE ON HISTONE MODIFICATIONS**

В. П. Максимова¹, О. Г. Усалка², Г. Р. Сагитова²,
А. А. Пацюркевич¹, М. Г. Якубовская¹, К. И. Кирсанов¹

¹ *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н. Н. Блохина, Москва*

² *Первый Московский государственный медицинский университет
им. И. М. Сеченова*

V. P. Maksimova¹, O. G. Usalka², G. R. Sagitova²,
A. A. Patsyurkevich¹, M. G. Yakubovskaya¹, K. I. Kirsanov¹

¹ *N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow*

² *Sechenov University, Moscow*

E-mail: lavarvar@gmail.com

Аннотация

Изучение влияния различных ксенобиотиков, в том числе гербицидов, инсектицидов и фунгицидов, на эпигенетическую регуляцию транскрипции является одной из наиболее актуальных задач современной молекулярной онкологии. В ходе данного исследования мы впервые продемонстрировали способность фунгицида тирама реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированных генов за счет влияния на ацетилирование гистонов.

Abstract

The study of the effect of various xenobiotics, including herbicides, insecticides and fungicides, on the epigenetic regulation of transcription is one of the most urgent problems of modern molecular oncology. During this work, we demonstrated for the first time the ability of the fungicide thiram to reactivate the expression of epigenetically repressed genes by affecting histone acetylation.

Introduction

The action of various environmental factors on a person can lead to inherited epigenetic changes, which in turn can cause neoplastic transformation. The most interesting agents for the analysis of epigenetic activity are hazardous chemicals, including various pesticides. Histone modifications play a key role in realizing the effects of exogenous agents on humans. The aim of this work was to study the epigenetic activity of 10 pesticides and to analyze the effect of epigenetically active agents on modifications of histones H3 and H4.

Materials and methods

The group of pesticides included: chlorpyrifos, glyphosate, carbalil, permethrin, captan, ziram, thiram, aldicarb, chlorothalonil, malathion. To analyze the epigenetic activity, HeLa TI cells with an epigenetically repressed retroviral vector carrying the GFP reporter gene were used. To analyze the changes in the level of post-translational modifications of histones H3 and H4 and changes in the expression of the HDAC1 protein, Western blot were used. To study the activity of histone acetyltransferases, the HAT Activity Assay Kit were used. Changes in the expression of genes encoding epigenetic regulatory enzymes were determined by qRT-PCR.

Results

Screening of the epigenetic activity of 10 pesticides showed that the fungicide thiram caused an increase in the number of GFP-positive cells increases by 6,7 times. It was shown that under the action of this agent, the global acetylation of histone H3 increased by 1,5 times. It was also demonstrated that after thiram treatment, there was a significant decrease in HDAC1 expression, both at the mRNA level (2,1 times) and at the protein level (3,2 times), and the expression of the *SIRT1* gene decreased (by 1, 8 times). In addition, there was no thiram effects on the activity of histone acetyltransferases, including the expression of the *HAT1*, *CREBBP*, *P300* genes. It was also shown that after fungicide treatment, there was no change in the methylation level of the sites H3K9me3, H4K20me3, H3K4me3, and the mRNA level of the histone methyltransferases SUV39H1,2 and SUV420H1,2 and SETD1A,1B did not change.

Conclusion

The data obtained demonstrate that the pesticide thiram causes the reactivation of epigenetically repressed genes by affecting histone acetylation.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ИНТРОНОВ ГЕНА-ХОЗЯИНА
МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК GAS5 КАК ИНСТРУМЕНТ
ФУНКЦИОНАЛЬНОГО АНАЛИЗА *

EDITING OF THE SMALL NUCLEOLAR RNA HOST-GENE
GAS5 INTRONS AS A TOOL FOR ITS FUNCTIONAL ANALYSIS

А. М. Матвеева ^{1,2}, Д. И. Виноградов ^{1,2}, Е. С. Журавлёв ¹, Г. А. Степанов ^{1,2}

¹Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
²Новосибирский государственный университет

A. M. Matveeva ^{1,2}, D. I. Vinogradov ^{1,2}, E. S. Zhuravlev ¹, G. A. Stepanov ^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
²Novosibirsk State University

E-mail: anastasiya.maatveeva@gmail.com

Аннотация

На основе клеток человека 293FT с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены клеточные линии с точечными мутациями в генах индивидуальных малых ядрышковых РНК, закодированных в интронах гена *Gas5* (Growth Arrest Specific 5), и протяженными делециями в гене *Gas5*. Исследовано влияние мутаций на сплайсинг длинной некодирующей РНК *Gas5*, предложена гипотеза о его m6A-зависимой регуляции.

Abstract

293FT-derived single cell clones were obtained with point mutations in individual *Gas5* (Growth Arrest Specific 5) intron-encoded small nucleolar RNA genes and large deletions in *Gas5* gene using CRISPR/Cas9. The effect of mutations on the long non-coding RNA *Gas5* splicing was studied and a hypothesis about its m6A-dependent regulation was suggested.

© А. М. Матвеева, Д. И. Виноградов, Е. С. Журавлёв, Г. А. Степанов, 2020

* 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).

Редактирование интронов — перспективный инструмент изучения механизмов посттранскрипционного созревания РНК. Объектом данных исследований выступили C/D-боксы малые ядрышковые РНК (мяоРНК), осуществляющие 2'-O-метиляцию нуклеотидов рРНК в процессе ее созревания. Ранее нами была показана возможность редактирования в клетках человека генов индивидуальных мяоРНК, закодированных в интронах гена *Gas5* (Growth Arrest Specific 5). В рамках данной работы был проведен функциональный анализ гена-хозяина мяоРНК с помощью редактирования генов мяоРНК системой CRISPR/Cas9 путем внесения точковых мутаций, а также формирования протяженных делеций в структуре гена *Gas5*.

На основе клеток 293FT были получены клеточные линии с индивидуальными мутациями в генах *SNORD75* и *SNORD81*. Путем независимых экспериментов (ОТ-ПЦР и полнотранскриптомного секвенирования RNA-Seq) была проведена оценка уровня зрелых мутантных форм РНК-мишеней, показано снижение уровня зрелой формы РНК *Gas5*, проанализированы формы сплайсинга и обнаружены новые варианты с пропуском экзонов. Биоинформатический анализ данных, представленных в доступных базах, выявил наличие в *SNORD75* и *SNORD81* специфических областей, участвующих в регуляции созревания предшественника днкРНК *Gas5*. Среди ассоциированных факторов была обнаружена группа факторов, осуществляющих и узнающих т6А модификацию, что позволило предположить т6А-зависимый путь регуляции сплайсинга *Gas5*.

На основе клеток 293FT были также получены линии с протяженными делециями в одном из аллелей *Gas5*. В описанных линиях методами ОТ-ПЦР и полнотранскриптомного секвенирования продемонстрировано снижение общего уровня транскриптов днкРНК *Gas5* и образование зрелой формы с пропуском экзонов. Данные, полученные для гетерозиготных клеточных линий, легли в основу гипотезы об активности только одного из двух аллелей *Gas5* в клетках 293FT.

**АНАЛИЗ РЕЗИСТОМА УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ
MORGANELLA MORGANII, ВЫДЕЛЕННЫХ
НА ТЕРРИТОРИИ ГОРОДА КАЗАНИ ***

**RESISTOME ANALYSIS OF UROPATHOGENIC
MORGANELLA MORGANII STRAINS ISOLATED IN KAZAN**

Л. Ф. Миннуллина, Э. Р. Шайдуллина, А. М. Марданова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: masaco@mail.ru

Аннотация

Определен спектр антибиотикорезистентности трех уропатогенных штаммов *M. morganii*, выделенных на территории г. Казани. Все штаммы обладают пониженной чувствительностью к имипенему, а штаммы ММ 1 и ММ 4 — резистентностью к тигециклину. В геномах штаммов идентифицированы гены *catA2* и *blaDHA*. Штаммы не являются продуцентами бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и не содержат плазмид-опосредованных детерминант резистентности.

Abstract

We investigated the antibiotic resistance of three uropathogenic *M. morganii* strains isolated in Kazan. All strains exhibited a low susceptibility to imipenem, whereas strains MM 1 and MM 4 showed resistance to tigecycline. Genome analysis identified *catA2* and *blaDHA* genes. The strains do not produce extended spectrum beta-lactamases and do not contain plasmid-mediated resistance genes.

Условно-патогенная бактерия *M. morganii* является возбудителем широкого спектра вне- и внутрибольничных инфекций. Целью работы стало определение спектра антибиотикорезистентности и анализ резистома уропатогенных штаммов *M. morganii*, различающихся по вирулентным свойствам.

Штаммы *M. morganii* ММ 1, ММ 4 и ММ 190, полученные из мочи больных с внебольничной инфекцией мочевыводящих путей (ИМП), были

© Л. Ф. Миннуллина, Э. Р. Шайдуллина, А. М. Марданова, 2020

* Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

отобраны из 4247 уропатогенных изолятов, выделенных в 2014–2015 гг. на базе ООО ЛДЦ «Биомед» (г. Казань). Методом последовательных микро-разведений показано, что все штаммы обладают сниженной чувствительностью к имипенему (МПК 2–4 мг/л) и устойчивостью к ампициллину (МПК 128–256 мг/л), амоксициллин-клавуланату (МПК 256/4 мг/л) и колистину (МПК 256 мг/л), что является проявлением их природной резистентности. Штаммы MM 1 и MM 4 оказались устойчивыми к тигециклину (МПК 1 мг/л). Программа MOB-suite v. 3.0.0 не обнаружила у штаммов плазмид. Однако программа AMRseq* идентифицировала в секвенированных геномах MM 1 (QUOO00000000), MM 4 (QPLM00000000) и MM 190 (QMKL00000000) хромосомные гены *catA2* и *blaDHA*, кодирующие хлорамфеникол-ацетилтрансферазу и AmpC цефалоспориноазу соответственно. Транслированная последовательность гена *catA2* штамма MM 1 (локус DYH52_RS05390) лишь на 43 % гомологична продуктам генов MM 4 (локус DVJ80_RS17395) и MM 190 (локус DQ401_RS16625). Также у штаммов MM 4 и MM 190 был выявлен ген *blaDHA-1* (локусы DVJ80_RS07320 и DQ401_RS09620 соответственно), а у штамма MM 1 — ген *blaDHA-27* (локус DYH52_RS02740).

Устойчивость к различным группам антибиотиков для одного и того же микроорганизма может варьировать в зависимости от региона. По данным платформы AMRmap**, изоляты *M. morgonii*, выделенные за последние 10 лет на территории РФ в случае внебольничных форм ИМП, обладают следующим профилем резистентности: 100,0 % проявляют устойчивость к ампициллину, 88,2 % — к фосфомицину, 75,0 % — к цефиксиму, 56,3 % — к цефокситину, а 91,7 % проявляют сниженную чувствительность (категория I) к имипенему. В целом штаммы *M. morgonii* MM 1, MM 4 и MM 190 обладают схожим профилем резистентности с большинством изолятов, выделенных в других регионах страны.

Таким образом, на основании оценки синергизма оксимино-β-лактамов с клавулановой кислотой и анализа резистоста, уропатогенные штаммы *M. morgonii* MM 1, MM 4 и MM 190 не являются продуцентами БЛРС и не содержат плаزمидо-опосредованных генов резистентности.

* URL: <https://amrseq.net/>

** URL: <https://amrmap.ru/>

**КОРРЕКЦИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ
В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОЙ ИНКУБАЦИИ КУР
ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ
ЭРИТРОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ**

**CORRECTION OF THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION
IN CONDITIONS OF INDUSTRIAL INCUBATION OF CHICKENS
TO INCREASE THE FUNCTIONALITY OF ERYTHROCYTES
AND LEUKOCYTES**

Т. В. Монстакова, Т. О. Азарнова, И. И. Кочиш

*Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина*

T. V. Monstakova, T. O. Azarnova, I. I. Kochish

*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology —
MVA named after K. I. Skryabin*

E-mail: tommi@list.ru

Аннотация

Глицинат кобальта в концентрации 0,05 %, используемый для трасовариальной обработки яиц перед инкубацией, обладает выраженными антиоксидантными и гематопротекторными свойствами, определяющими сохранение и улучшение функциональности клеток крови (эритроцитов и лейкоцитов), обуславливая повышение эмбриональной жизнеспособности и качества молодняка.

Abstract

Cobalt glycinate at a concentration of 0,05 %, used for trasovarian processing of eggs before incubation, has pronounced antioxidant and hematoprotective properties that determine the preservation and improvement of the functionality of blood cells (erythrocytes and leukocytes), causing an increase in embryonic viability and the quality of young animals.

Избыточная генерация свободных радикалов, обусловленная окислительным стрессом, сопряженным с условиями промышленной инкубации, неизбежно приводит к чрезмерному накоплению продуктов липоперокси-

дации. Это определяет деструктивные явления и дисфункцию клеток крови. Известно, что эритроциты наиболее подвержены этому негативному явлению, способствующему нарушению возможности переноса питательных веществ, снижению газотранспортных, деформационных, защитных, буферных и других их функций, важных для эмбриона.

Наряду с этим известно, что и клетки лейкоцитарного ряда при прогрессии окислительного стресса теряют способность не только к фагоцитозу, но в целом к защите организма, обеспечению регенерации и другим своим предназначениям.

Для коррекции заявленных негативных явлений нами был синтезирован биостимулятор глицинат кобальта, наносимый на яйцо перед инкубацией в концентрации 0,05 %.

Исследование сыворотки крови цыплят суточного возраста показало снижение основных токсических продуктов ПОЛ: ИДС на 9,9 %, ДК в 1,3 раза, ТК на 2,2 %, ОДК на 23,4 %, ОШ на 11 %, при повышении ОАА на 28,3 %.

Обеспечение условий для сохранения целостности эритроцитов и активности ферментов синтеза обусловило увеличение эритроцитов на 8,9 % и гемоглобина на 13,8 %, создавая перспективы лучшей трофики тканей эмбриона и профилактики гипоксии. Наряду с этим снизилась вероятность патологической микровезикуляции, определив увеличение площади поверхности, а вместе с тем и ее соотношения к объему в 1,1 раза по сравнению с контролем, создавая условия для лучшей деформации.

Несмотря на то что количество лейкоцитов в опыте и контроле было равнозначным, изменение в лейкоцитарной формуле в виде повышения количества моноцитов на 2,10 % указывает на возрастание фагоцитарной активности, а также повышение ИСЛМ на 8,21, отражающий взаимоотношение звеньев иммунологического процесса.

Сохранение функциональности эритроцитов и лейкоцитов определило повышение эмбриональной жизнеспособности особей (вывод цыплят и выводимость яиц превосходили контроль на 5,6 и 6,6 %) и их качества (преимущество по шкалам «Пасгар» и «Оптистарт» соответствовало 0,8 и 0,9 балла).

**ВЛИЯНИЕ LMNB1 НА РЕПЛИКАТИВНОЕ СТАРЕНИЕ
ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА****THE EFFECT OF LMNB1 IN REPLICATIVE SENESENCE
OF HUMAN FIBROBLASTS**Е. Е. Морозова¹, П. П. Лактионов^{1,2}, П. Сингх^{1,3}¹ *Новосибирский государственный университет*² *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск*³ *Школа медицины Назарбаев Университет, Нур-Султан,
Республика Казахстан*E. E. Morozova¹, P. P. Laktionov^{1,2}, P. Singh^{1,3}¹ *Novosibirsk State University*² *Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk*³ *Nazarbayev University School of Medicine, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan*

E-mail: morozovae613@gmail.com

Аннотация

В ходе старения клетки начинают демонстрировать характерные морфологические и метаболические изменения. Клеточное старение сопровождается масштабными пространственными перестройками ядра, приводящими к формированию специальных ядерных структур конденсированного хроматина (SAHF) и ассоциированной со старением деконденсацией центромер (SADS). Снижение уровня компонента ядерной оболочки ламина В1 приводит к нарушению структуры хроматина и, как предполагается, участвует в механизме формирования SAHF и SADS. В результате проделанной работы получены генетические конструкции, кодирующие различные направляющие РНК для получения делеции гена LMNB1 с помощью CRISPR / Cas9. Была получена гетерогенная популяция клеток первичных фибробластов человека, несущих делецию гена LMNB1.

Abstract

Senescent cells demonstrate characteristic morphological and metabolic changes. Cellular senescence is accompanied by large-scale spatial rearrangements of the nucleus leading to the formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and senescence-associated distension of centromeres (SADS). A decrease in the level of the nuclear

envelope component of lamin B1 leads to disruption of the chromatin structure and it is supposed to be involved in the mechanism of SAHF and SADS formation. As a result of the work done genetic structures coding different guide RNAs to receive LMNB1 gene deletion by CRISPR/Cas9 were obtained. A heterogeneous population of cells of primary human fibroblasts carrying the LMNB1 gene deletion was obtained.

Introduction

Aging is a natural process that leads to gradual decrease in the afunctional capabilities of the organism. Cellular senescence is tightly linked with general organism ageing, as senescent cells accumulate in body tissues with age. Senescent cells demonstrate characteristic morphological and metabolic changes. Cellular senescence is accompanied by large-scale spatial rearrangements of the nucleus leading to the formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and senescence-associated distension of centromeres (SADS). A decrease in the level of the nuclear envelope component of lamin B1 leads to disruption of the chromatin structure and it is supposed to be involved in the mechanism of SAHF and SADS formation. Lamins take part in numerous regulatory cellular processes that influence cell proliferation, differentiation, and apoptosis. The aim of the work is to characterize the role of lamin B1 in replicative cellular senescence.

Methods

To generate primary human fibroblasts carrying the LMNB1 gene deletion we used CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis. Guide RNAs were chosen using the CRISPR Design resource and cloned into PX459 vector. The efficiency of guide RNAs was determined using pEGxxFP system with following analysis by flow cytometry. Developed CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis system was applied on LF1 primary lung fibroblasts cell strain.

Results

Genetic structures coding different guide RNAs to receive LMNB1 gene deletion by CRISPR/Cas9 were obtained. The efficiency of guide RNAs was determined by flow cytometry and the most effective were chosen for further work. Optimization of targeted mutagenesis conditions by the CRISPR/Cas9 method for removal of the coding region of the LMNB1 gene in primary human fibroblasts was carried out. A heterogeneous population of cells of primary human fibroblasts carrying the LMNB1 gene deletion was obtained.

**ДНК-АПТАМЕРЫ В РАСТВОРЕ: ТРЁХМЕРНАЯ СТРУКТУРА,
КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ,
СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ***

**DNA APTAMERS IN SOLUTION: STRUCTURE, CONFORMATIONAL
CHANGES, SPECIFIC BINDING**

Р.В. Морячков¹, В.Н. Заблуда¹, А.С. Кичкайло¹,
В.А. Спиридонова², А.Н. Берлина³, А.Е. Соколов¹

¹Федеральный исследовательский центр
Красноярский научный центр СО РАН

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

³Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

R. V. Moryachkov¹, V. N. Zablude¹, A. S. Kichkailo¹,
V. A. Spiridonova², A. N. Berlina³, A. E. Sokolov¹

¹Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS

²Lomonosov Moscow State University

³A. N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow

E-mail: mrv@iph.krasn.ru

Аннотация

Аптамеры — короткие олигонуклеотиды, способные специфически связываться с молекулярными мишенями благодаря своей уникальной пространственной форме. Определение их структуры может дать информацию о функциональных особенностях аптамеров и природе их избирательности. В данной работе представлены подходы по определению пространственной структуры ДНК-аптамеров и их конформационных изменений напрямую в растворе с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния.

Abstract

Aptamers are short oligonucleotides that can specifically bind to molecular targets due to their unique spatial shape. Determination of their structure can provide information on the functional characteristics of aptamers and the nature of their selectivity. This work

© Р.В. Морячков, В.Н. Заблуда, А.С. Кичкайло, В.А. Спиридонова, А.Н. Берлина, А.Е. Соколов, 2020

* Работа выполнена при поддержке РФФИ по проекту № 19-32-90266.

presents approaches to determining the spatial structure of DNA aptamers and their conformational changes directly in solution using small-angle X-ray scattering.

Аптамеры обычно селективно подбирают к мишени с помощью систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения [1]. На практике используются олигонуклеотидные однотяжевые цепочки длиной 10–100 оснований. Их применяют в терапии и диагностике, для доставки лекарств к определенным биомолекулам, клеткам, тканям и целым органам, в изготовлении различных биосенсоров для детектирования определенных белков, биомаркеров, ионов тяжелых металлов, вирусов или бактерий [2, 3]. Аптамеры обладают преимуществами перед антителами в том, что они имеют гораздо меньшие размеры, дешевы в изготовлении и не вызывают иммунный ответ в организме, причем для каждого аптамера легко создать антидот. Для идентификации способа связывания аптамера, определения его активного сайта, с целью повышения специфичности и аффинности, а также для возможности оптимизации его структуры возникает необходимость исследования пространственной структуры данного типа биомолекул. Ввиду сложности выращивания кристалла из однотяжевых нуклеиновых кислот для исследования с применением рентгеноструктурного анализа ведется поиск методов характеристики структуры аптамеров напрямую в растворе. В данной работе приведены примеры использования метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) для изучения пространственной структуры аптамеров, изменения их конформации при изменении внешних условий [4, 5]. Нами была разработана методика, в которой с помощью методов МУРР и молекулярного дизайна строится молекулярная модель молекулы в растворе и сравнивается с экспериментальными данными для проверки корректности модели [6].

Литература

1. Tuerk C., Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science*. 1990. Vol. 249. P. 505–510.
2. Радько С. П. и др. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики // *Биомедицинская химия*. 2007. Т. 53. С. 5–24.
3. Meyer C. et al. Cell-specific aptamers as emerging therapeutics // *Journal of Nucleic Acids*. 2011. 904750. P.1–18.
4. Svergun D. I., Koch M. H. J. Small-angle scattering studies of biological Macromolecules in solution // *Reports on Progress in Physics*. 2003. Vol. 66. P. 1735.
5. Mertens H. D. T., Svergun D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering // *Journal of structural biology*. 2010. Vol. 172. P. 128–141.
6. Tomilin F. N. et al. Four steps for revealing and adjusting the 3D structure of aptamers in solution by small-angle X-ray scattering and computer simulation // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2019. Vol. 411. P.6723–6732.

**ВЛИЯНИЯ ОСТРОГО ВВЕДЕНИЯ TC-2153 НА ЭКСПРЕССИЮ
СЕРТОНИНОВЫХ 5-HT_{1A} И 5-HT₇ РЕЦЕПТОРОВ
И ТРАНСКРИПТОВ BDNF У РУЧНЫХ И АГРЕССИВНЫХ КРЫС ***

**THE EFFECT OF TC-2153 ON THE EXPRESSION OF SEROTONINERGIC
5-HT_{1A} AND 5-HT₇ RECEPTORS AND BDNF TRANSCRIPTS
IN TAME AND AGGRESSIVE RATS**

В. С. Москалюк, Р. В. Кожемякина, Д. В. Базовкина,
В. С. Науменко, Е. А. Куликова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

V. S. Moskaliuk, R. V. Kozhemyakina,
D. V. Bazovkina, V. S. Naumenko, E. A. Kulikova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

E-mail: v.moskaliuk@g.nsu.ru

Аннотация

Агрессивные и ручные крысы (ИЦИГ СО РАН) различаются по уровню белка BDNF и серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов. Показано влияние психотропного вещества TC-2153 на экспрессию BDNF и серотониновых рецепторов. В данной работе мы обнаружили эффекты генотипа и препарата на экспрессию различных транскриптов BDNF и рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT₇.

Abstract

Aggressive and tame rats (ICG SB RAS) differ in BDNF and serotonin 5-HT_{1A} receptors protein levels. The psychotropic drug TC-2153 affects both the expression of BDNF and serotonin receptors. In this study, we have found the genotype and drug effects on expression of different BDNF transcripts and serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors.

© В. С. Москалюк, Р. В. Кожемякина, Д. В. Базовкина, В. С. Науменко, Е. А. Куликова, 2020

* The study was supported by the Russian Scientific Foundation grant № 19-15-00029. Cost of animal maintenance was supported by basic research project № 0324-2019-0041-C-01.

Introduction

Rats, selectively bred for high level (aggressive) and absence (tame) of aggression towards humans (Institute of Cytology and Genetics) demonstrate significant difference in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein level and expression of serotonin receptors. Benzopentathiepin TC-2153 is known to affect the BDNF and serotonergic system and produces anti-aggressive behavior. The aim of this study was to evaluate the effect of TC-2153 on the expression of BDNF transcripts and serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ in tame and aggressive rats.

Materials and Methods

Aggressive ($n = 30$) and tame ($n = 30$) adult male rats were treated with 10 or 20 mg/kg TC-2153 or vehicle. mRNA levels of eight BDNF transcripts 201–208 (Ensembl Database) and serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors were measured in the midbrain and hippocampus using RT-PCR. Data were analyzed with two-way ANOVA (genotype and drug), followed by the post-hoc Fisher's test. Statistical significance was set at $p < 0,05$.

Results

Tame rats demonstrated elevation of all BDNF transcripts except 206 in hippocampus and 5-HT_{1A} receptor gene expression in both investigated brain structures, compared to aggressive. While aggressive rats showed higher mRNA level of transcript 206 and 5-HT₇ receptor in hippocampus and BDNF transcripts 203, 203, 204, 206 and 207 in midbrain in comparison to those in tame rats. TC-2153 decreased the expression of transcripts 202, 203, 204 and 205 in the midbrain of aggressive rats and transcripts 202, 203, 204, 205, 207 and 208 in the midbrain of tame rats, without effect in hippocampus. The drug decreased the mRNA level of 5-HT_{1A} receptor in hippocampus of both strains and the 5-HT₇ receptor in hippocampus of aggressive animals.

Conclusion

We demonstrated the significant influence of selection to tame and aggressive behavior and drug TC-2153 on the different transcripts of BDNF and serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors. Thereby the investigated genes could be involved in the mechanisms of aggressive behavior and in the anti-aggressive effect of TC-2153.

**ВЛИЯНИЕ ПОСТЕПЕННОГО ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА
БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ
ИГОЛАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД***

**EFFECT OF GRADUAL TEMPERATURE RISE ON EXPRESSION
OF ENERGY METABOLISM GENES IN BAIKAL ENDEMIC
AND HOLARCTIC AMPHIPODS**

А. Д. Мутин¹, К. П. Верещагина¹, Л. Якоб²,
Д. С. Бедулина¹, М. Лукассен², М. А. Тимофеев¹

¹ Иркутский государственный университет

² Институт полярных и морских исследований
им. Альфреда Вегенера, Бремерхафен, Германия

A. D. Mutin¹, K. P. Vereshchagina¹, L. Jakob², D. S. Bedulina¹,
M. Lucassen², M. A. Timofeyev¹

¹ Irkutsk State University

² Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre
for Polar and Marine Research, Bremerhaven, Germany

E-mail: andreimutin97@gmail.com

Аннотация

Проведена оценка экспрессии ключевых генов энергетического метаболизма и оценка межвидовых различий в энергетическом метаболизме у байкальских эндемичных и голарктических амфипод.

Abstract

In the present study, the expression of key energy metabolism genes was evaluated, and interspecific differences in energy metabolism in Baikal endemic and Holarctic amphipods were assessed.

© А. Д. Мутин, К. П. Верещагина, Л. Якоб, Д. С. Бедулина, М. Лукассен, М. А. Тимофеев, 2020

* The work was supported by the Russian Science Foundation / Helmholtz Association of German Research Centres (grant number 18-44-06201).

The aim of this study was to assess the expression of key energy metabolism genes and assess interspecific differences in energy metabolism in Baikal endemic amphipods of species *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) and *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb., 1874), as well as the Holarctic species *Gammarus lacustris* Sars, 1863, under gradual temperature increase.

The control group was maintained at a temperature of $6 \pm 0,8$ °C throughout the experiment. The experimental group was exposed under conditions of gradual temperature increase ($0,8$ °C/day) for 24 days. For further analysis, animals were frozen in liquid nitrogen at temperatures of $12,4$, $18,8$ and $23,6$ °C of experimental exposure.

According to the results of the study, a significant increase in the expression of *heat shock protein 70 (HSP70)* gene in the Baikal species *E. verrucosus* was shown when the temperature increased ($18,8$ and $23,6$ °C), while the expression of *Na⁺, K⁺-ATPase, ATP-synthase (alpha subunit)* and *phosphofructokinase* genes decreased under these conditions. For the thermotolerant Baikal species *E. cyaneus*, a significant increase in the expression of *HSP70* genes, as well as *hexokinase, oxoglutarate dehydrogenase, actin, ATP-synthase (gamma subunit)* was observed, while the expression of *Na⁺, K⁺-ATPase* and *ATP-synthase (alpha subunit)* genes was significantly reduced. In the Holarctic species *G. lacustris*, there was a significant increase in the expression of *ATP-synthase (gamma subunit)* and *HSP70* genes, while hexokinase expression significantly decreased.

According to the results of correlation analysis of the expression values of the studied genes in the species *E. verrucosus*, a strong positive correlation between *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* and *citrate synthase* was shown. The Baikal *E. cyaneus* had a strong positive correlation between the expression values of the *actin* and *HSP70* genes. For *G. lacustris*, a strong positive correlation between *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* and *pyruvate kinase* gene expression values was shown.

Thus, it has been shown that all studied amphipod species are characterized by different energy supply strategies during a gradual temperature increase. Correlation analysis showed interspecific differences at the level of co-expression of the studied genes. The obtained data indicate more pronounced changes in gene expression under gradual temperature increase in two Baikal amphipod species compared to Holarctic.

CRISPR-CAS СИСТЕМЫ В МИКРОБИОМЕ КИШЕЧНИКА БОЛЬНЫХ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ ***CRISPR-CAS SYSTEMS IN HUMAN GUT MICROBIOMES IN HEALTH AND DISEASE: IDENTIFICATION AND DIVERSITY**

М. С. Никитин^{1,2}, А. С. Ковтун^{1,2}, В. Н. Даниленко^{1,2},
Н. В. Захаревич¹, И. И. Артамонова^{1,3}

¹*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва*

²*Московский физико-технический институт*

³*Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича, Москва*

M. S. Nikitin^{1,2}, A. S. Kovtun^{1,2}, V. N. Danilenko^{1,2}, N. V. Zakharevich¹,
I. I. Artamonova^{1,3}

¹*The Vavilov Institute of General Genetics, Moscow*

²*Moscow Institute of Physics and Technology*

³*Institute for Information Transmission Problems RAS, Moscow*

E-mail: mikhail.nikitin@phystech.edu

Аннотация

Основная функция CRISPR-Cas-систем — обеспечивать иммунный ответ у бактерий и архей при помощи коротких последовательностей, заимствованных из инородных для клетки элементов. В работе исследовалось разнообразие таких систем в микробиомах здоровых людей и людей, больных ожирением или расстройствами аутистического спектра (РАС).

Abstract

CRISPR-Cas systems provide protection of bacterial and archeal cells from viruses and plasmids invasion using small pieces of their DNA embedded in cellular genome. In this work, we investigated CRISPR-Cas systems diversity in gut microbiomes of healthy people and people with obesity or autism spectrum disorders.

Микробиом кишечника является самым многообразным в человеческом организме как по количеству входящих в него видов, так и по выполняемым функциям. К последним относятся пищеварение, защита от патогенов, поддержка иммунной системы, регуляция метаболизма и другие. Было показано, что существует взаимосвязь между составом микробиома кишечника и такими болезнями, как РАС, болезни Альцгеймера и Паркинсона, ожирение и т. п. Поэтому описание и сравнительный анализ CRISPR-Cas систем в кишечных микробиомах здоровых людей и больных ожирением или РАС может быть интересно не только с точки зрения фундаментальной науки, но и для диагностики и терапии соответствующих заболеваний.

Для исследования были взяты несколько когорт испытуемых. Данные, относящиеся к больным ожирением и соответствующей контрольной группе, были взяты из открытых источников проекта MetaHIT (Metagenome of Human Intestinal Tract). Испытуемые не имели других болезней и были разделены на больных и здоровых на основании индекса массы тела с критическим значением в 30 кг/м^2 . Данные, относящиеся к больным РАС, были получены в ходе недавно завершеного проекта по поиску генных маркеров болезни в кишечном микробиоме.

Для нахождения CRISPR-Cas-кассет в метагеномных данных мы разработали процедуру, основанную на сопоставлении и последующей фильтрации результатов работы программ CRISPRCasFinder, Piler-CR и CRISPR Recognition Tool (CRT). Для отсеивания ложноположительных предсказаний мы выбирали кассеты, обнаруженные всеми тремя программами, либо находящиеся рядом с системой Cas-белков. Построенный список кассет был дополнен предсказанными структурами, повторы которых похожи по последовательности на повторы ранее утвержденных кассет.

В рамках исследования были обработаны микробиомы 331 испытуемого в рамках исследования ожирения и 60 — для исследования РАС. Для количественного сравнения разнообразия CRISPR-Cas-систем были выделены следующие характеристики: количество кассет в расчете на 1 Гб собранных контигов, среднее количество спейсеров в полных кассетах, количество и доля уникальных относительно ранее изученных кассет повторов. Первые два параметра отражают разнообразие кассет и спейсеров в них, последние же два — тот факт, что большинство исследований посвящено микробиомам здоровых людей.

Для сравнения выборок был использован t-критерий Стьюдента для неравных выборок с критическим значением 0,05. Испытуемые в исследовании ожирения были разделены на три группы на основании длины ридов

и технологии секвенирования. Для этих групп результаты сравнения по вышеописанному методу показали, что лишь для одной из групп значимо отличается длина полных кассет, при этом остальные гипотезы о значимости различия средних не выполняются.

Для исследования РАС данные были разделены на две группы, так же на основе отличия протоколов секвенирования. Сравнение показало, что количество и длина кассет статистически значимо не отличаются.

ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ЦИАНО-ЕНОН-СОДЕРЖАЩИЕ
ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ
КАК ИНГИБИТОРЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕХЕНХИМАЛЬНОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *

SEMISYNTHETIC CYANO ENONE-BEARING POLYCYCLIC
COMPOUNDS AS INHIBITORS OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL
TRANSITION OF TUMOR CELLS

К. В. Одаренко^{1,2}, А. В. Сенькова¹, О. В. Саломатина^{1,3},
Н. Ф. Салахутдинов³, М. А. Зенкова¹, А. В. Марков¹

¹ Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

² Новосибирский государственный университет

³ Новосибирский институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

K. V. Odarenko^{1,2}, A. V. Sen'kova¹, O. V. Salomatina^{1,3},
N. F. Salakhutdinov³, M. A. Zenkova¹, A. V. Markov¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

² Novosibirsk State University

³ N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS

E-mail: k.odarenko@yandex.ru

Аннотация

Проанализирован эффект четырех циано-енон-содержащих производных глицирретовой и дезоксихолевой кислот на подвижность опухолевых клеток. Установлено, что наиболее активное соединение СМ эффективно ингибирует эпителиально-мезенхимальную трансформацию (ЭМТ) клеток А549, активированных TGF- β , и метастазирование меланомы В16 *in vivo*. С помощью *in silico* подхода выявлено, что JNK1 и MMP-2/-9 могут рассматриваться в качестве первичных мишеней СМ.

© К. В. Одаренко, А. В. Сенькова, О. В. Саломатина, Н. Ф. Салахутдинов, М. А. Зенкова, А. В. Марков, 2020

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 17-75-20120.

Abstract

The effect of 4 cyano-enone-bearing derivatives of glycyrrhetic and deoxycholic acids on motility of tumor cells was investigated. The most active compound SM was shown to inhibit epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of TGF- β -activated A549 cells and metastatic potential of melanoma B16 *in vivo*. Using *in silico* approach, it was found that JNK1 and MMP-2/-9 can be considered as primary targets of SM.

Известно, что введение циано-еноновой фармакофорной группы в структуру природных полициклических молекул способствует значительному усилению уровня их биоактивности. Ранее нашей группой были синтезированы и исследованы циано-енон-содержащие производные глицирретовой (СМ, ТМ) и дезоксихолевой (pi-153, pi-156) кислот, обладающие выраженным противоопухолевым потенциалом (рис. 1). Целью настоящей работы являлась оценка способности данных соединений ингибировать процесс ЭМТ опухолевых клеток, лежащий в основе их метастазирования.

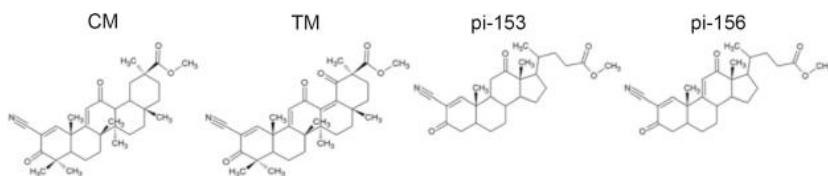


Рис. 1. Химические структуры циано-енон-содержащих производных глицирретовой (СМ, ТМ) и дезоксихолевой (pi-153, pi-156) кислот

В результате оценки способности исследуемых производных модулировать подвижность клеток меланомы мыши В16 и аденокарциномы легких человека А549 *in vitro* (*scratch assay*, нетоксичные концентрации) было выявлено производное СМ, достоверно подавляющее миграцию на обоих клеточных моделях.

Установлено, что СМ (0,5 мкМ) достоверно ингибирует процессы, связанные с приобретением клетками А549 мезенхимального высокоподвижного фенотипа при их активации TGF- β , включая приобретение клетками веретенообразной формы, усиление их миграционных (рис. 2, А) и инвазионных (рис. 2, В) характеристик. Кроме этого, инкубация TGF- β -стимулированных клеток А549 в присутствии СМ приводила к значительному усилению экспрессии эпителиального маркера Е-кадгерина и снижению экспрессии мезенхимальных маркеров фибронектина и виментина (рис. 2, В). Выявленная способность СМ блокировать ЭМТ опухолевых клеток была

далее верифицирована на мышинной модели меланомы B16 — было показано, что шестикратное внутрибрюшинное введение CM (25 мг/кг) эффективно снижало количество поверхностных метастазов в легких и усиливало экспрессию эпителиальных маркеров E-кадгерина и ZO-1 в метастатических узлах.

Далее с помощью хемоинформатического подхода нами был определен список потенциальных белковых мишеней CM. В результате анализа генной ассоциативной сети, реконструированной на основе выявленных мишеней и генов, чувствительных к действию TGF- β , идентифицированы мишени CM, наиболее вовлеченные в процесс ЭМТ: JNK1, MMP-2 и -9. С помощью молекулярного докинга установлена способность CM связываться с АТФазным доменом JNK1 и каталитическими доменами MMP-2 и -9 (рис. 2, Г).

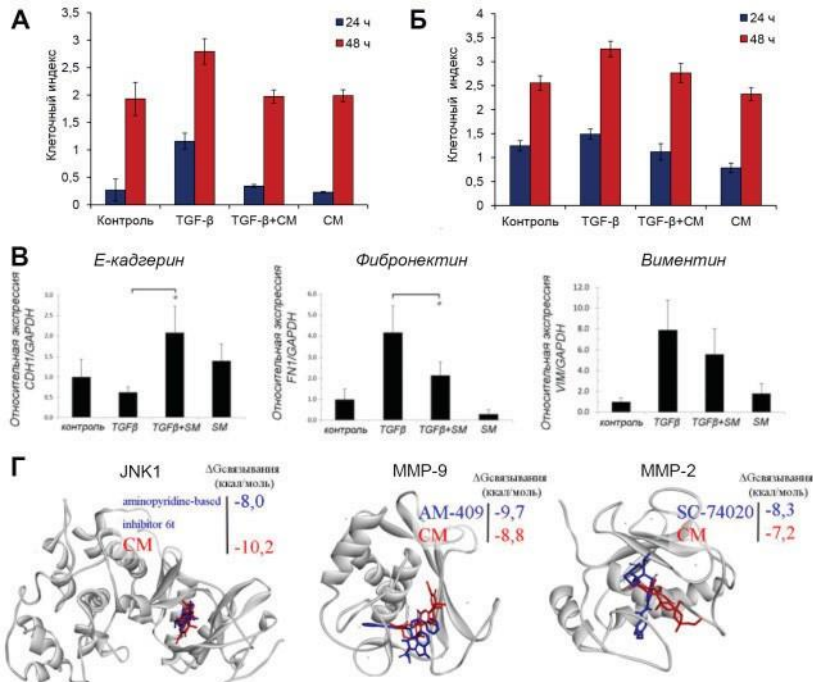


Рис. 2. Оценка подвижности (А) и инвазивной активности (Б) клеток A549, инкубированных в присутствии или отсутствии CM и TGF- β с помощью технологии xCelligence. В. Относительные уровни экспрессии маркеров ЭМТ в клетках A549 (данные RT-PCR). Г. Докинг-комплексы CM с JNK1, MMP-9 и MMP-2 в сайтах связывания их селективных ингибиторов

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ
В ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА
С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОЙ МОРФОМЕТРИИ**

**QUANTIFYING MITOCHONDRIAL NETWORKS IN PRIMARY
FIBROBLAST CELL CULTURE USING AUTOMATED IMAGE ANALYSIS**

Е. В. Панферов^{1,2}, В. А. Ныров^{1,3},
П. А. Слижов¹, Р. И. Глушаков¹, И. М. Спивак^{1,2}

¹ Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский Государственный университет

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

E. V. Panferov^{1,2}, V. A. Nyrov^{1,3}, P. A. Slizhov¹,
R. I. Glushakov¹, I. M. Spivak^{1,2}

¹ S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg

² St. Petersburg State University

³ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

E-mail: panferov.aux@gmail.com

Аннотация

Предложен алгоритм количественного анализа митохондриальных сетей, показавший свою эффективность при исследовании влияния геропротекторов на первичные фибробласты больного с сегментарной прогерией — синдромом Коккейна.

Abstract

In this article we propose an algorithm for the quantitative analysis of mitochondrial networks, which has shown its effectiveness in studying the effect of geroprotectors on the primary fibroblasts of a patient with segmental progeria — Cockayne's syndrome.

Митохондриальные сети формируются в различных клетках организма. Наиболее подробно они описаны в фибробластах. К настоящему времени опубликованы результаты исследований, показывающих, что характерные митохондриальные сети можно наблюдать в первичных фибробластах человека [2] и что их структура может нарушаться при воздействии внешних

факторов, например, при гипоксии [1], или в клетках, полученных от пациентов с митохондриальными заболеваниями [2] или страдающих одной из форм ранней болезни Паркинсона, в основе которой лежат мутации гена *parkin* [4], или от больных с поздней инфантильной формой нейронального цероидного липофуциноза, в основе которой лежит мутация гена *TPP1* одной из сериновых протеаз *Tripeptidyl Peptidase 1* [3]. Ранее мы показали нарушение митохондриальных сетей при экранировании электромагнитного поля Земли [5, 7]. Количественная оценка этих изменений часто вызывает затруднения у исследователей в связи со сложностью анализа прижизненных препаратов. Целью данной работы являлось создание простого в использовании алгоритма, позволяющего количественно оценить изменения в морфологии митохондриальных сетей.

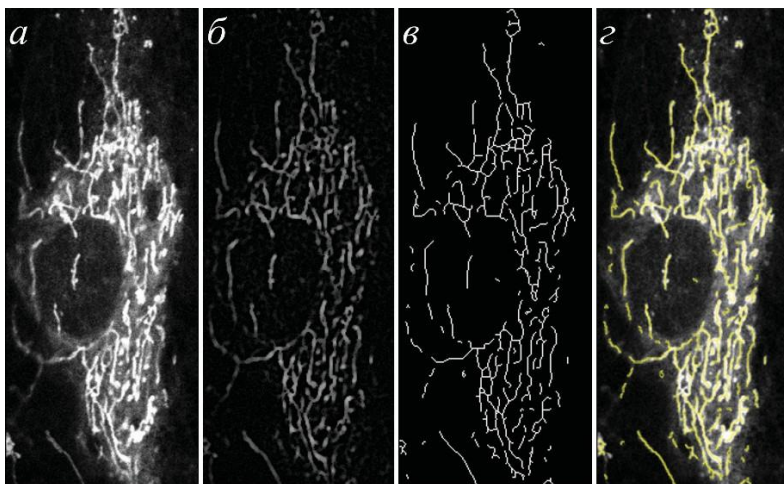


Рис. 1. Схема процесса обработки изображения: *а* — необработанные данные, *б* — результат подготовки изображения к бинаризации, *в* — итоговая сегментация, *г* — результат сегментации, наложенный поверх исходного изображения

Для визуализации митохондриальной сети в клеточных культурах использовалась прижизненная окраска флуоресцентным красителем MitoTracker GreenFM. Микрофотографии сетей были получены при помощи конфокального микроскопа TCS SP5. Дальнейшая обработка и анализ производились в свободно распространяемой программе ImageJ. Полученные изображения были подготовлены к сегментации при помощи частотно-

го фильтра (Bandpass Filter) с последующим вычитанием фона (Subtract Background). Контраст полученного в результате изображения улучшался за счет адаптивного выравнивания гистограммы (CLAHE). Шум был сглажен при помощи применения медианного фильтра к точкам, яркость которых существенно отличалась от окружающих (Remove Outliers). Полученные после обработки изображения были подвергнуты бинаризации по методу Оцу (Threshold), после чего к ним была применена операция скелетонизации (Skeletonize). Далее с помощью плагина AnalyzeSkeleton была проведена оценка числа пересечений (ветвлений) сети, средней и максимальной длины фрагментов, а также общей длины митохондрий. Полученные данные были проанализированы при помощи критерия Краскела — Уолиса в программном языке R.

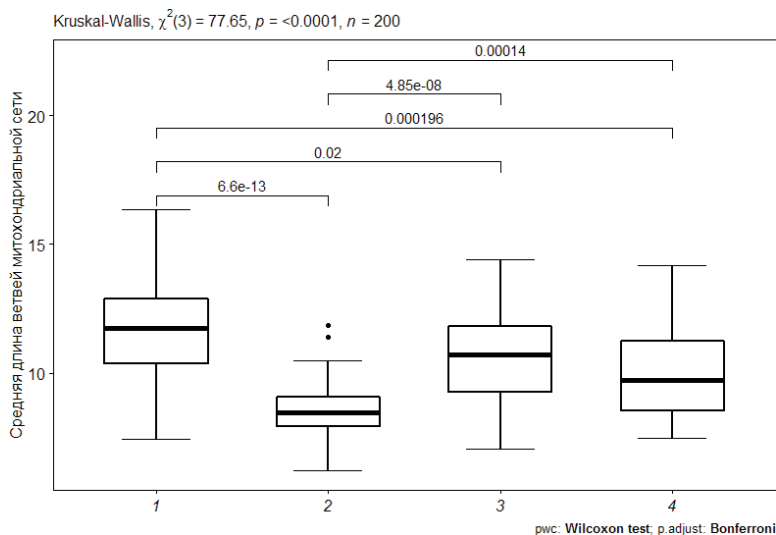


Рис. 2. Результаты сравнения первичных фибробластов по средней длине сетей. 1 — здоровый контроль, 2 — клетки больного с синдромом Коккейна, 3 — клетки больного с добавлением SkQ, 4 — клетки больного с добавлением метформина

Эффективность этого алгоритма показана на примере влияния геропротектора SkQ1 на фибробласты больного с синдромом Коккейна, являющегося аутосомным рецессивным наследственным синдромом с прогероидными чертами.

Литература

1. Baracca A., Sgarbi G., Padula A., Solaini G. Glucose plays a main role in human fibroblasts adaptation to hypoxia // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013. Vol. 45(7). P. 1356–1365.
2. Benard G., Bellance N., James D., Parrone P., Fernandez H., Letellier T., Rossignol R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization // *J. Cell Science*. 2007. Vol. 120 (5). P. 838–848.
3. Van Beersel G., Tihon E., Demine S., Hamer I., Jadot M., Arnould T. Different molecular mechanisms involved in spontaneous and oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation in tripeptidyl peptidase-1 (TPP-1)-deficient fibroblasts // *Bioscience Reports*. 2013. Vol. 33 (2). e00023.
4. van der Merwe C., Loos B., Swart C., Kinnear C., Henning F., van der Merwe L., Pillay K., Muller N., Zaharie D., Engelbrecht L., Carr J., Barden S. Mitochondrial impairment observed in fibroblasts from South African Parkinson's disease patients with parkin mutations // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014. Vol. 447(2). P. 334–340.
5. Стефанов В. Е., Щеголев Б. Ф., Крячко О. В., Кузьменко Н. В., Сурма С. В., Спивак И. М. Модельное исследование биологических эффектов слабых статических магнитных полей на организменном и субклеточном уровнях. // *Доклады РАН*. 2015. Т. 461. № 4. С. 485–488.
6. Stefanov V. E., Shchegolev B. F., Kriachko O. V., Kuzmenko N. V., Surma S. V., Spivak I. M. Model study of biological effects of weak static magnetic fields at the organismic and subcellular levels // *Doklady Biological Sciences*, 2015. Vol. 461. P. 116–119.
7. Спивак И. М., Куранова М. Л., Мавропуло-Столяренко Г. Р., Сурма С. В., Щеголев Б. Ф., Стефанов В. Е. Клеточный ответ на воздействие сверх слабых статических магнитных полей // *Биофизика*. 2016. Т. 61. № 3. С. 516–522.
8. Spivak I. M., Kuranova M. L., Mavropulo-Stolyarenko G. R., Surma S. V., Shchegolev B. F., Stefanov V. E. The cell's response to extremely weak static magnetic fields // *Biophysics*. 2016. Vol. 61. No 3. P. 435–439. IF0.122.

НОВЫЙ ХИМЕРНЫЙ АДЕНОВИРУС ЭФФЕКТИВЕН ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ КОКСАКИ-АДЕНОВИРУСНОГО РЕЦЕПТОРА *

NEW CHIMERIC ADENOVIRUS IS EFFECTIVE AGAINST TUMOR CELLS
WITH REDUCED COXSACKIE-ADENOVIRUS RECEPTOR EXPRESSION

А. П. Парамоник, С. С. Куцейкин, И. Д. Осипов, С. В. Нетесов

Новосибирский государственный университет

P. Paramonik, S. S. Kutseikin, I. D. Osipov, S. V. Netesov

Novosibirsk State University

E-mail: pa99@ngs.ru

Аннотация

Был сконструирован онколитический штамм аденовируса Ad6/3-hTERT-GMCSF, несущий химерный белок фибера, расширяющий спектр опухолевых мишеней для терапии препаратами на основе аденовируса серотипа 6 (Ad6). Показана повышенная цитотоксичность в отношении клеток линии MDA-MB-231, экспрессирующих в низком количестве первичный рецептор для природного Ad6.

Abstract

An oncolytic adenovirus strain Ad6/3-hTERT-GMCSF was constructed. It carries chimeric fiber protein that broadens the spectrum of tumor targets for Ad6-based therapy. Increased cytotoxicity towards MDA-MB-231 cells expressing low amounts of the primary receptor for wild type Ad6 was shown.

Одними из самых распространенных векторов для онколитиков являются аденовирусы. Наиболее часто используется аденовирус серотипа 5 (Ad5). Однако он обладает рядом недостатков, что наталкивает исследователей на поиск альтернативных серотипов.

Одним из вариантов является использование Ad6 в качестве онколитического агента [1, 2]. Тем не менее Ad5 и Ad6 для проникновения использу-

© А. П. Парамоник, С. С. Куцейкин, И. Д. Осипов, С. В. Нетесов, 2020

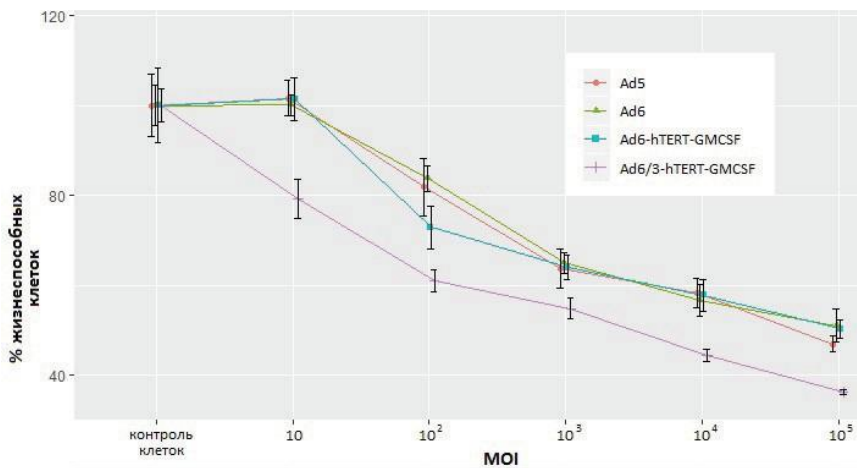
* Работа поддержана в рамках государственного задания по финансированию НИР № FSUS-2020-0035 и Программы ТОП-100 НГУ.

ют коксаки-аденовирусный рецептор (CAR), экспрессия которого снижена во многих опухолях. Возможным решением является сдвиг специфичности вируса за счет создания химерного белка фибера, отвечающего за связывание с первичным рецептором.

Ранее в лаборатории была получена шаттл-плазида, несущая участки аденовируса серотипа 6 со вставками промотора hTERT и гена GMCSF. В ходе данной работы с помощью гомологичной рекомбинации *in vitro* была произведена замена начального фрагмента гена белка фибера на фрагмент аденовируса серотипа 3. Аденовирус серотипа 3 в качестве первичного рецептора использует белок десмоглеин, широко распространенный среди опухолей. В результате был получен штамм Ad6/3-hTERT-GMCSF, несущий вставку промотора hTERT для аттенуации вирусной репликации, гена GMCSF для усиления иммуногенности, а также химерный белок фибера.

Далее мы сравнили активность различных рекомбинантных вариантов вируса в отношении клеток линии MDA-MB-231 со сниженной экспрессией CAR [3]. Клетки заражали вирусом в MOI (количестве вирусных частиц на клетку) от 10 до 10^5 и инкубировали в поддерживающей питательной среде при температуре 37 °C. Цитотоксическая активность вирусов была измерена спустя 72 часа после заражения.

Наибольшую цитотоксичность показал химерный штамм вируса Ad6/3-hTERT-GMCSF. При этом достоверные различия между действием данного



Сравнение цитотоксичности штаммов аденовируса на культуре клеток MDA-MB 231. Данные представлены в виде $\bar{x} \pm \text{SEM}$

штамма и действием штаммов с немодифицированным белком фибером наблюдаются во всех разведениях, начиная с минимального. При заражении вариантом Ad6/3-hTERT-GMCSF в максимальном MOI выживает всего 36,2 % клеток, в то время как при заражении остальными штаммами в той же дозе вируса процент жизнеспособности клеток составляет около 50 %. Таким образом, данная модификация расширяет спектр опухолей, подлежащих лечению рекомбинантными аденовирусами серотипа 6.

Литература

1. Romanenko M. V. et al. Oncolytic Effect of Adenoviruses Serotypes 5 and 6 Against U87 Glioblastoma Cancer Stem Cells // *Anticancer Res.* 2019. Vol. 39. № 11. P. 6073–6086.
2. Shashkova E. V., May S. M., Barry M. A. Characterization of human adenovirus serotypes 5, 6, 11, and 35 as anticancer agents. // *Virology.* 2009. Vol. 394. № 2. P. 311–320.
3. Mach N. et al. Spectrum-wide exploration of human adenoviruses for breast cancer therapy // *Cancers (Basel).* 2020. Vol. 12. № 6. P. 1–18.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ОБЗОР ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ХАРАКТЕРИСТИК ПРОГРАММ СИНТЕЗА ГЕНОВ
И КЛЮЧЕВЫХ ПАРАМЕТРОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ
ПРИ ОПТИМИЗАЦИИ ИХ СТРУКТУРЫ ***

**COMPARATIVE OVERVIEW OF FUNCTIONAL CHARACTERISTICS
OF GENES SYNTHESIS PROGRAMS AND KEY PARAMETERS USED
IN OPTIMIZING OF THEIR STRUCTURE**

И. М. Переверзев ¹, Н. А. Торгашева ¹,
О. И. Голосова ², А. В. Тиунов ², Г. Ю. Шевелев ¹

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Новосибирский центр информационных технологий «Унипро»*

I. M. Pereverzev ¹, N. A. Torgasheva ¹,
O. I. Golosova ², A. V. Tiunov ², G. Y. Shevelev ¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
² *Unipro Center for Infomation Technologies, Novosibirsk*

E-mail: pereverzevi1994@mail.ru

Аннотация

Нами было разработано программное обеспечение для анализа и оптимизации кодонного состава генных последовательностей, а также разбиения генных конструкций на олигонуклеотиды для последующей сборки из олигонуклеотидов. Проведено сравнение программ, используемых для разбиения генной последовательности на олигонуклеотиды для сборки, по выбранным нами критериям. Показано, что созданная нами программа разбивает генную последовательность на олигонуклеотиды наиболее оптимальным образом.

© И. М. Переверзев, Н. А. Торгашева, О. И. Голосова, А. В. Тиунов, Г. Ю. Шевелев, 2020

* Работа выполнена при поддержке Базового проекта «Разработка и создание искусственных систем для целей синтетической биологии» Нацпроект Наука. 0245-2019-0002 (Молодежные лаборатории) (ГЗ-0009) (2019–2020 гг.)

Abstract

We have developed software for the analysis and codon optimization of gene sequences, as well as splitting gene constructs into oligonucleotides for subsequent assembly from oligonucleotides. A comparison of the programs used for splitting the gene sequence into oligonucleotides for assembly was carried out according to the criteria we selected. It was shown that the program we created splits the gene sequence into oligonucleotides in the most optimal way.

Одной из отличительных особенностей синтетической биологии является дизайнерский подход, широко применяемый к созданию биологических молекул или живых организмов, в результате которого происходит значимое изменение свойств соответствующих объектов относительно их природных аналогов.

Знание основных программных решений, имеющихся в открытом доступе, позволяет выбрать оптимальную комбинацию программных инструментов для успешного решения задач, связанных с дизайном, и синтезом соответствующих объектов. Данная работа посвящена анализу функциональных характеристик программ, используемых для синтеза генов, а также разбору ключевых параметров, используемых при оптимизации их структуры. В работе проведена попытка охватить основные продукты, используемые для синтеза генов, находящиеся в открытом доступе.

Три модельные последовательности, длиной 717, 402 и 700 п. о., были разбиты на олигонуклеотиды для дальнейшей сборки методом полимерной циклической сборки при помощи различных программ: DnaWorks, GeneDesign, GeneGenie (интернет-ресурсы) и GeneCut (разработанная нами программа). Разбиения проводились для различных длин и различных температур плавления перекрывающихся концов олигонуклеотидов. Для каждого разбиения были подсчитаны: разброс длин и температур плавления перекрывающихся концов олигонуклеотидов, суммарная длина олигонуклеотидов. На основании этих параметров было проведено сравнение разбиений различными программами. В результате сравнения было определено, что при разбиении программой GeneCut суммарная длина олигонуклеотидов получается наименьшей среди всех программ. Разница в суммарной длине олигонуклеотидов при разбиении GeneCut и другими программами составляет до 20 %, что позволяет сократить расходы на синтез олигонуклеотидов.

Литература

1. Hoover D. M., Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis // *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol. 30(10). P. 2–7. doi.org/10.1093/nar/30.10.e43
2. Swainston N., Currin A., Day P. J., Kell D. B. GeneGenie: optimized oligomer design for directed evolution // *Nucleic Acids Research*. Vol. 42. Iss. W1. P. W395–W400. doi.org/10.1093/nar/gku336
3. Richardson S. M., Nunley P. W., Yarrington R. M., Boeke J. D., Bader J. S. GeneDesign 3.0 is an updated synthetic biology toolkit // *Nucleic Acids Research*. 2010. Vol. 38(8). P. 2603–2606. doi.org/10.1093/nar/gkq143
4. Richardson S. M., Wheelan S. J., Yarrington R. M., Boeke J. D. GeneDesign: Rapid, automated design of multikilobase synthetic genes // *Genome Res*. 2006. P. 550–556.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ТИПОВ ФАЗЕОЛИНА С КОЛИЧЕСТВЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ**RELATIONSHIP OF PHASEOLIN TYPES WITH QUANTITATIVE TRAITS OF COMMON BEANS**

К. О. Плотников, В. А. Рябина, Н. В. Блажко, С. Е. Пашковский

Научно-исследовательский центр «ИННОВАЦИИ», Новосибирск

K. O. Plotnikov, V. A. Ryabinina, N. V. Blazhko, S. E. Pashkovsky

Research Centre «Innovations», Novosibirsk

Аннотация

Представлены данные о генетическом скрининге образцов фасоли по типу фазеолина методом ПЦР и белкового электрофореза, и его взаимосвязи с количественными признаками. Типирование проводилось по методике, предложенной J. Kami и соавторами. Изучены 23 сорта фасоли Новосибирского ГАУ. В ходе исследования установлено, что 20 сортов обладают Т-типом фазеолина, 2 сорта — S-типом и 1 сорт — N-типом. Обнаружены значимые различия между сортами с разным типом фазеолина по числу семян с растения и по массе 1000 семян.

Abstract

Results on the genetic screening of bean samples by phaseolin genotyping by PCR and SDS-PAGE electrophoresis are presented. PCR genotyping was performed according to the method proposed by J. Kami et. al. 23 varieties of beans from Novosibirsk state agricultural university were studied by phaseolin type. The analysis showed that 20 varieties were T-type phaseolin, 2 varieties — S-type and 1 varieties had N-type. The presence of significant differences between varieties with different types of phaseolin in the number of seeds per plant and the weight of 1000 seeds was found.

Фазеолин — основной запасной белок семян фасоли. Он имеет несколько типов, наиболее распространенными являются S- и Т-. Также отмечается наличие связи между типом фазеолина и некоторыми ценными хозяйственными признаками, например содержанием общего белка.

В данной работе проведено типирование по фазеолину 23 сортов фасоли зерновой с применением SCAR маркеров ПЦР и SDS-PAGE электрофореза.

Также проведен анализ взаимосвязи с количественными признаками (масса семян с растения, масса 1000 семян).

По результатам проведенного исследования было установлено, что 20 сортов обладали Т-типом фазеолина, 2 сорта — S-типом и 1 сорт имел N-тип, который ранее не определялся методом ПЦР. Для уточнения типов фазеолина был использован белковый электрофорез в денатурирующих условиях.

При сопоставлении данных типирования с количественными показателями, представленными в таблице, установлено наличие различий между сортами с разным типом фазеолина по числу семян с растения (Uэмп. = 0; Uкрит. = 4) и по массе 1000 семян (Uэмп. = 1; Uкрит. = 4). Высокой массой 1000 семян обладали сорта с Т-типом фазеолина, тогда как сорта с S-типом имели большее число семян с растения.

Данные по числу семян с растения и массе 1000 семян по сортам

Наименование сорта	Тип фазеолина	Число семян с растения, шт.	Масса 1000 семян, г
Veenoorl	T	25,20	463,70
Creola	T	33,40	299,90
Мухранула	T	18,50	543,30
Оран	T	52,00	256,40
Stringless	T	30,30	325,30
Katia	T	33,20	389,70
Bomba	T	39,40	319,50
Sanario	T	34,00	355,30
Красно-пестрая	T	23,60	488,50
Ключики белые	T	43,20	335,20
Романово	T	25,60	455,40
Мечта хозяйки	T	33,60	433,30
Зуша пестрая	T	23,00	614,50
Бийчанка пестрая	T	16,00	411,20
Лукерья	T	56,40	357,70
Инга	T	35,80	266,40
Рубин	T	33,30	445,90
Зуша белая	T	33,40	539,50
Пестрая	T	28,90	401,20
Золотистая	T	40,40	404,80
Зуша черная	S	67,20	243,10

Наименование сорта	Тип фазеолина	Число семян с растения, шт.	Масса 1000 семян, г
Нерусса	S	95,20	193,90
Brunot	N	28,2	344,3

Полученные данные говорят о том, что тип фазеолина возможно использовать как молекулярный маркер при селекции фасоли зерновой по продуктивности, так как имеются статистически значимые результаты о его связи с ценными количественными признаками (масса 1000 семян, число семян с растения).

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ
ДЛЯ РАННЕЙ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ПРИЖИВАЕМОСТИ ИМПЛАНТОВ
У ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

**PROSPECTS FOR USING BUCCAL EPITHELIUM
FOR EARLY NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF IMPLANT SURVIVAL
IN PEOPLE OF DIFFERENT AGES**

А. А. Полякова, Д. С. Медведев

Санкт-Петербургский педиатрический медицинский университет

A. A. Polyakova ¹, D. S. Medvedev ²

St. Petersburg State Pediatric Medical University

E-mail: aapol13@yandex.ru

Аннотация

В настоящее время большинство пациентов стоматологического профиля среднего и пожилого возраста нуждаются в замещении дефектов зубных рядов с помощью имплантации. В связи с этим актуальной проблемой современной геронтологии и стоматологии является разработка методик по улучшению приживаемости зубных имплантов. Одним из неинвазивных методов для достижения этой цели является использование молекулярной диагностики на материале буккального эпителия (БЭ).

Abstract

Currently, the majority of middle-aged and elderly dental patients require replacement of dentition defects using implantation. In this regard, an urgent problem of modern gerontology and dentistry is the development of methods to improve the survival rate of dental implants. One of the non-invasive methods to achieve this goal is the use of molecular diagnostics on the material of the buccal epithelium (BE).

В настоящее время большинство пациентов стоматологического профиля среднего и пожилого возраста нуждаются в замещении дефектов зубных рядов с помощью имплантации. В связи с этим актуальной проблемой современной геронтологии и стоматологии является разработка методик по

улучшению приживаемости зубных имплантов. Одним из неинвазивных методов для достижения этой цели является использование молекулярной диагностики на материале буккального эпителия (БЭ).

В исследование были включены 2 группы пациентов среднего возраста (45–59 лет) и пожилого возраста (60–75 лет), N = 10 для каждой группы. БЭ был собран по стандартной методике и подвергнут иммуноцитохимическому окрашиванию. В качестве первичных маркеров использовали моноклональные антитела к COX1, COX2, клаудину-10. В качестве вторичных антител использовали AlexaFluor 647. Морфометрию проводили на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980 и оценивали относительную площадь экспрессии исследуемого маркера.

Нами было установлено, что уровень экспрессии COX1 и клаудина-10 у лиц пожилого возраста снижается в 9,6 и 4,3 раз по сравнению с этим показателем у лиц средней возрастной группы. Экспрессия COX2 лиц пожилого возраста достоверно повышается в 5 раз по сравнению с этим показателем у лиц средней возрастной группы. Проведенные исследования показали, что уровень экспрессии клаудина-10 снижен у людей старшей возрастной группы, что выражается в нарушении плотных контактов между эндотелиальными клетками, а также снижении полярности клеток и скорости передачи сигналов, что влечет за собой значительное снижение числа успешных имплантаций у людей пожилого возраста. Поскольку COX2 является маркером воспаления, уровень его экспрессии увеличивается в старшей возрастной группе, увеличение этого маркера также может являться прогностическим маркером успеха имплантации.

Выявленное возрастное изменение экспрессии пула сигнальных молекул в БЭ у пациентов, проходящих замещение дефектов зубных рядов с помощью имплантации, может явиться основой для разработки нового метода определения эффективности лечения этой патологии и ее диагностики на ранних стадиях в зависимости от возраста пациента и давать прогноз об успехе проводимого лечения.

КОРЕКЦИЯ АЦИДОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ У ЭМБРИОНОВ ИНДЕЕК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ

CORRECTION OF ACIDOTIC STATES IN TURKEY EMBRYOS BY USING FERULIC ACID

А. М. Резвых, Т. О. Азарнова, В. И. Максимов, И. С. Луговая

*Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина*

A. M. Rezvykh, T. O. Azarnova, V. I. Maksimov, I. S. Lygovaya

*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology —
MVA named after K.I. Skryabin*

E-mail: rezvyh.99@mail.ru

Аннотация

Феруловая кислота, обладающая выраженными антиоксидантными и обменостимулирующими свойствами, определяющими оптимизацию водородного показателя крови, обуславливает повышение качества и жизнеспособности молодняка индек.

Abstract

Ferulic acid, which has pronounced antioxidant and metabolism-stimulating properties that determine the optimization of the pH of the blood, leads to an increase in the quality and vitality of young turkeys.

Гипоксия, неизбежно сопровождающая на разных этапах эмбриогенез сельскохозяйственной птицы вследствие накопления организмом избытка органических кислот, обуславливает развитие ацидоза, приумножающееся действием сопровождающих промышленную инкубацию факторов стресса, что снижает качество и жизнеспособность эмбрионов и молодняка сельскохозяйственной птицы.

Для коррекции заявленных негативных явлений на яйцах индек «Хайбрид Конвертер» трансовариально использовали феруловую кислоту, которая способствовала деинтенсификации липопероксидации (аномально воз-

растающей при воздействии сильных стрессоров), что выразилось в снижении цитотоксичных продуктов: изолированных двойных связей в 1,2, диеновых конъюгатов в 1,6 ($p < 0,001$), триеновых конъюгатов и оксодиеновых конъюгатов равнозначно в 1,1, оснований Шиффа в 1,4 раза при увеличении антиокислительной активности в 1,5 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Заявленное обусловило повышение интенсивности центральных метаболических процессов, а также их взаимосвязи, обусловив рост рН у индюшат суточного возраста на 1,07 % по сравнению с контролем и щелочной резервности крови на 8,5 %. Зафиксированные изменения являлись позитивными, так как сопровождалась повышением вывода индексов на 12,02 % ($p < 0,01$) и выводимости яиц на 6,66 %; а также преимуществом особей по шкалам «Пасгар» и «Оптистарт» на 0,5 балла ($p < 0,05$) и на 1,0 балл ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с контролем.

**ВОЗМОЖНОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОТЕИНКИНАЗЫ
CDK8 ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ:
СРАВНЕНИЕ С ЦИТАРАБИНОМ ***

**EFFICACY OF CDK8 INHIBITION VERSUS CYTARABINE
IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA**

М. Д. Родионова ¹, Е. А. Варламова ², А. В. Брутер ²

¹ *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

² *Институт биологии гена РАН, Москва*

M. D. Rodionova ¹, E. A. Varlamova ², A. V. Bruter ²

¹ *ITMO University, St. Petersburg*

² *Institute of Gene Biology RAS, Moscow*

Email: demettoria@gmail.com

Аннотация

Селективное ингибирование транскрипционной протеинкиназы CDK8 — новый перспективный метод индукции гибели клеток острого миелоидного лейкоза.

Abstract

CDK8 is a promising therapeutic target for acute myeloid leukemia due to efficacy of its inhibition, lack of toxicity and tolerance in patients.

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — тяжелая форма гемобластозов. Стандартное лечение цитарабином и производными антрациклинов сопровождается полиорганной токсичностью, что обуславливает необходимость поиска новых терапевтических подходов. В патогенезе ОМЛ установлена роль протеинкиназы CDK8, важная для высокого транскрипционного потенциала опухолевых клеток. Селективные ингибиторы CDK8 хорошо переносятся в эксперименте и могут быть перспективны в таргетной терапии ОМЛ.

© М. Д. Родионова, Е. А. Варламова, А. В. Брутер, 2020

* Работа поддержана грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение 14.W03.31.0020 с Институтом биологии гена РАН).

Цель

Определить способность ингибитора CDK8 вызывать гибель культивируемых клеток ОМЛ в сравнении с цитарабином.

Материалы и методы

Клетки линии ОМЛ человека MV4.11 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ глутамин при 37 °С, 5 % CO₂. Цитотоксичность цитарабина и селективного ингибитора CDK8 сенексина В оценивали в МТТ-тесте после инкубации клеток; диапазон исследуемых концентраций 0,1–12,8 мкМ. Для изучения распределения фаз клеточного цикла в культуру MV4.11 (5·10⁴ клеток в 3 мл среды) добавляли сенексин В или цитарабин до конечных концентраций 0,5 мкМ по отдельности или в комбинации. Через 1–3 сут клетки лизировали в буфере, содержащем неионный детергент и пропидия иодид, и анализировали флуоресценцию ядер в проточном цитофлуориметре.

Результаты

Ингибитор CDK8 вызывает гибель клеток MV4.11: IC₅₀ сенексина В 0,17 ± 0,005 мкМ, цитарабина 0,4 ± 0,003 мкМ. Гибель клеток происходит по механизму апоптоза: через 72 ч инкубации с сенексином В доля клеток в фазе G1 снизилась до 41 %, с цитарабином — до 29,15 %, в комбинации сенексин В+цитарабин — до 15,9 %, а в контроле этот показатель составил 56 %. Распределение клеток в фазах S и G2/M при инкубации с сенексином В незначительно отличалось от контрольных клеток (11,5 и 7,99 % против 12,3 и 8,06 % соответственно), при инкубации с цитарабином снижалась до 9,9 % в S-фазе и до 4,6 % в G2/M, а при использовании комбинации снижалась до 7,9 и 3,8 %. Через 3 суток инкубации клеток MV4.11 доля «событий» в субG1 области (апоптотическая фрагментация ДНК) возрастала до 39–41 % при действии сенексина В, до 56,3 % в ответ на цитарабин и до 72,3 % при комбинации препаратов по сравнению с 21 % в интактных клетках.

Выводы

В субмикромольных концентрациях фармакологический ингибитор CDK8 вызывает апоптоз клеток ОМЛ (по нарастанию доли ядер с фрагментированной ДНК в линии MV4.11). В комбинации с цитарабином ингибитор CDK8 вызывает значительно более выраженную гибель клеток, чем при использовании одного цитарабина. Эти результаты подтверждают перспективность селективного воздействия на CDK8 в терапии ОМЛ. Отсутствие общерезорбтивной токсичности ингибиторов CDK8 для взрослого организма позволяет считать перспективным их применение в клинике.

**ЭФФЕКТ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *HTR7* В СРЕДНЕМ МОЗГЕ
НА ПЛАСТИЧНОСТЬ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА
У МЫШЕЙ ЛИНИИ ASC – ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ДЕПРЕССИИ ***

**EFFECT OF *HTR7* GENE OVEREXPRESSION IN MIDBRAIN ON
PLASTICITY OF THE BRAIN SEROTONIN SYSTEM OF ASC MICE—
THE GENETIC MODEL OF DEPRESSION**

А. Я. Родный, И. А. Барабошкина, Т. В. Ильчибаева, Е. В. Антонов,
Е. А. Куликова, Д. В. Базовкина, В. С. Науменко

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

A. Ya. Rodnyy, I. A. Baraboshkina, T. V. Ilchibaeva, E. V. Antonov,
E. A. Kulikova, D. V. Bazovkina, V. S. Naumenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

E-mail: aleksandr1994rodny@gmail.com

Аннотация

Мышам линии ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению в средний мозг вводились аденоассоциированные вирусные частицы, несущие плазмиду pAAV_Syn_HTR7-EGFP, обеспечивающую сверхэкспрессию гена *Htr7*, что привело к достоверному повышению подвижности в тесте Порсолта и повышению индекса метаболизма серотонина (5-HT). Полученные результаты указывают на снижение депрессивно-подобного поведения.

Abstract

Adeno-associated viral particles carrying pAAV_Syn_HTR7-EGFP, providing overexpression of *Htr7* gene, were injected in midbrain of ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) strain mice with genetic predisposition to depressive-like behaviour that resulted in significant mobility increase in Porsolt test and an increase in the serotonin (5-HT) metabolic index. The results indicate a decrease in depressive-like behavior.

© А. Я. Родный, И. А. Барабошкина, Т. В. Ильчибаева, Е. В. Антонов, Е. А. Куликова, Д. В. Базовкина, В. С. Науменко, 2020

* Работа поддержана грантом РФФ № 19-15-00025. Животные содержались за счет средств бюджетного проекта № 0324-2019-0041-С-01.

Депрессивные расстройства являются сложной медико-социальной задачей из-за их высокой распространенности в современном обществе, снижения работоспособности и повышенного риска самоубийств. Несмотря на это, патогенез депрессивных расстройств до конца не ясен. Основным препятствием является ограниченное число животных моделей. В лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН была получена линия мышей ASC с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению, что открывает возможности для исследования механизмов депрессии и способов ее коррекции с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Среди большого количества гипотез возникновения депрессивных расстройств большое внимание уделяется серотониновой гипотезе. Большой интерес представляют рецепторы серотонина 5-НТ_{1А} и 5-НТ₇, способные формировать гетеродимеры, что ведет к интернализации пресинаптического рецептора 5-НТ_{1А}, ответственного за ингибирование выброса серотонина в синаптическую щель. Изучение механизма и последствий гетеродимеризации между 5-НТ_{1А} и 5-НТ₇ рецепторами в условиях сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецепторов в норме и при развитии патологии является актуальным вопросом для понимания нейробиологических механизмов депрессии и разработки новых, более эффективных методов терапевтического воздействия.

Было показано достоверное повышение подвижности в тесте Порсолта в группе AAV_HTR7_EGFP. Уровень экспрессии 5-НТ₇ в среднем мозге ожидаемо повысился, а уровень экспрессии 5-НТ_{1А} изменился. Однако индекс метаболизма серотонина в группе AAV_HTR7_EGFP достоверно повысился во всех исследованных структурах.

Таким образом, впервые показан антидепрессивный эффект в результате сверхэкспрессии гена *Htr7*, кодирующего 5-НТ₇ рецептор, на линии ASC — генетической модели депрессии.

**ЭФФЕКТОКАУТАГЕНА *CC2D1A*, КОДИРУЮЩЕГО
ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР FREUD-1,
В ГИППОКАМПЕ НА НЕЙРОТРОФИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ ***

SUPPRESSION EFFECT OF *CC2D1A* GENE ENCODING
TRANSCRIPTIONAL FACTOR FREUD-1 IN HIPPOCAMPUS
ON NEUROTROPHIC SYSTEM

А. Я. Родный, Д. В. Ерёмин,
Т. В. Ильчибаева, В. С. Науменко, Е. М. Кондаурова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

A. Ya. Rodnyy, D. V. Eremin, T. V. Ilchibaeva,
V. S. Naumenko, E. M. Kondaurova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

E-mail: aleksandr1994rodny@gmail.com

Аннотация

Мышам линии C57Bl/6 в гиппокамп вводились аденоассоциированные вирусные частицы, несущие плазмиду AAV_Syn_shRNA-Freud-1 для подавления экспрессии гена *Cc2d1a*, что привело к ухудшению пространственной памяти и обучения. Кроме того, экспрессия гена *Creb* оказалась сниженной, экспрессия гена *c-Fos* повышенной, а экспрессия белка proBDNF повысилась.

Abstract

Adeno-associated viral particles carrying AAV_Syn_shRNA-Freud-1 plasmid for suppression *Cc2d1a* gene expression were injected in hippocampus of C57Bl/6 mice, which resulted in spatial memory and learning impairment. In addition, the *Creb* gene mRNA expression was decreased, mRNA of *c-Fos* gene was increased and the expression of proBDNF protein was increased.

Freud-1 (CC2D1A, Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A) принимает участие в имеющих критическое значение для функционирования нейронов и их дифференциации внутриклеточных сигнальных процессах, опосредуемых транскрипционным фактором NF- κ B, АКТ, CREB (Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1). Одним из наиболее изученных эффекторов, влияющих на функцию нейронов, является CREB, активирующий важную для пластичности мозга и памяти программу транскрипции. Одним из самых важных факторов для нормального функционирования долговременной памяти, обучения и нейрогенеза является нейротрофический фактор мозга (BDNF). Известно, что посредством TrkB рецепторов CREB напрямую регулирует транскрипцию гена *Bdnf*, однако до сих пор неизвестно, как Freud-1 влияет на BDNF систему.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы стало изучение эффекта нокаута гена *Cc2d1a* в гиппокампе на экспрессию BDNF, TrkB, p75^{NTR} и CREB, а также на пространственную память и обучение.

Тестирование в водном лабиринте Морриса показало, что мыши из контрольной AVV_Scr группы успешно запомнили расположение платформы к четвертому дню, тогда как мыши из опытной группы AAV_shRNA_Freud-1 продолжали терпеть неудачу в попытках найти платформу, а также проводили меньше времени в целевом сегменте лабиринта (где ранее располагалась платформа) по сравнению с контрольной группой.

Нокаут гена *Cc2d1a* не повлиял ни на экспрессию мРНК гена *Bdnf*, ни на экспрессию зрелой формы белка BDNF, однако экспрессия белка proBDNF достоверно повысилась в группе AAV_shRNA_Freud1. В то же время экспрессия p75^{NTR} и TrkB не изменилась. Уровень мРНК гена *Creb* был снижен в группе AAV_shRNA_Freud-1 по сравнению с группой AVV_Scr. Кроме того, была измерена экспрессия генов *c-Fos* и *Arc* как генов быстрого реагирования связанных с нейропластичностью — уровень мРНК *c-Fos* достоверно повысился в группе AAV_shRNA_Freud-1, а уровень мРНК *Arc* не изменился.

Таким образом, впервые было показано влияние транскрипционного фактора Freud-1 на BDNF-систему через регуляцию гена *Creb*.

ХИМЕРНЫЕ ИММУНОГЕНЫ, НЕСУЩИЕ ФРАГМЕНТЫ GP41 ВИЧ-1, СОДЕРЖАЩИЕ ЭПИТОПЫ BNABS *

CHIMERIC IMMUNOGENS CARRYING FRAGMENTS GP41 HIV-1 CONTAINING EPITOPES OF BNABS

А. П. Рудомётов, Н. Б. Рудомётова, Д. Н. Щербаков,
А. А. Ильичёв, Л. И. Карпенко

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

A. P. Rudometov, N. B. Rudometova, D. N. Shcherbakov,
A. A. Ilyichev, L. I. Karpenko

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

E-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Аннотация

В данной работе описываются результаты исследования, направленного на получение и изучение антигенных и иммуногенных свойств экспериментальных ВИЧ-иммуногенов, несущих фрагменты gp41 ВИЧ-1. Показано, что полученные иммуногены взаимодействуют с bnAbs, а при иммунизации лабораторных животных образуются ВИЧ-специфические антитела, обладающие нейтрализующей активностью.

Abstract

This paper describes the results of a study aimed at obtaining and studying the antigenic and immunogenic properties of experimental HIV immunogens carrying HIV-1 gp41 fragments. It has been shown that the obtained immunogens interact with bnAbs, and during the immunization of laboratory animals, HIV-specific antibodies with neutralizing activity are formed.

Несмотря на то что в лечении антиретровирусными препаратами ВИЧ-инфицированных пациентов достигнут значительный прогресс, в настоящее время считается, что только эффективная вакцина против ВИЧ-1 сможет

© А. П. Рудомётов, Н. Б. Рудомётова, Д. Н. Щербаков, А. А. Ильичёв, Л. И. Карпенко, 2020

* Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-583.2020.4 (Соглашение от 07.04.2020 г. № 075-15-2020-001).

положить конец пандемии ВИЧ/СПИДа. В поддержку этого мнения может говорить текущая пандемия COVID-19 на примере различных стран Африки, в которых ресурсы, предназначенные для борьбы с ВИЧ, перенаправлены на борьбу с COVID-19, что увеличивает риск новых инфекций и количество смертей, связанных с ВИЧ/СПИД.

На данный момент исследователи едины во мнении, что В-клеточный иммуноген должен быть направлен на консервативные антигенные детерминанты поверхностных гликопротеинов ВИЧ-1 и индуцировать антитела, способные нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (bnAbs). В исследованиях показано, что введение нейтрализующих антител может блокировать инфекцию у нечеловеческих приматов, что еще раз подчеркивает важность достижения формирования bnAbs с помощью вакцинации. Более того, исследования bnAbs к ВИЧ показывают, что успешная вакцина против вирусов с высокой антигенной вариабельностью должна в конечном итоге формировать пул поликлональных нейтрализующих антител к консервативным участкам вируса.

Целью данной работы было получение серии экспериментальных иммуногенов, несущих фрагменты gp41 ВИЧ-1 и исследование их антигенных и иммуногенных свойств.

Ранее нами были получены и охарактеризованы два рекомбинантных иммуногена МРЕР-ТВ1 и YkuJ-MPER, содержащих по два участка МРЕР (membrane-proximal external region) ВИЧ-1. На основе последовательности, кодирующей YkuJ-MPER, были получены четыре генетических конструкции с вариациями в эпитопах bnAbs 10E8. С помощью дот-блот-анализа установлено, что полученные иммуногены взаимодействуют с моноклональными антителами 10E8, 2F5 и 4E10. На основе полипептида МРЕР-ТВ1 получены варианты, содержащие фрагменты пептида слияния ВИЧ-1, фланкированные разными ливерными последовательностями. Получены рекомбинантные плазмиды, кодирующие эти иммуногены.

Полученными конструкциями YkuJ-MPER, несущими варианты МРЕР области, была проведена иммунизация кроликов по двум схемам. Первая схема иммунизации включала трехкратное введение МРЕР-ТВ1 и однократное введение смеси трех вариантов YkuJ-MPER; вторая схема иммунизации включала трехкратное введение трех вариантов YkuJ-MPER и однократное введение МРЕР-ТВ1. Анализ нейтрализующей активности сывороток показал, что иммунизация кроликов по схеме 1 индуцирует образование вирус-специфичных антител, способных нейтрализовать env-псевдовиром SF162 (субтип В, tier 1).

Таким образом, сконструированные химерные белки могут быть использованы в различных стратегиях иммунизации, направленных на формирование нейтрализующих ВИЧ-1 антител.

**СКРИНИНГ ПАНЕЛИ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ
МОНОТЕРПЕНОИДОВ НА СПОСОБНОСТЬ БЛОКИРОВАТЬ
ПРОНИКНОВЕНИЕ ПСЕВДОВИРСУОВ ВИЧ-1 В КЛЕТКУ-МИШЕНЬ***

**SCREENING OF THE PANEL OF COMPOUNDS BASED
ON MONOTERPENOIDS FOR THE ABILITY TO BLOCK PENETRATION
OF HIV-1 PSEUDOVIRUS INTO A TARGET CELL**

Н. Б. Рудомётова¹, Н. С. Щербакова¹, Д. Н. Щербаков¹,
Л. И. Карпенко¹, А. С. Соколова², О. И. Яровая²

¹Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

²Новосибирский институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

N. B. Rudometova¹, N. S. Shcherbakova¹, D. N. Shcherbakov¹,
L. I. Karpenko¹, A. S. Sokolova², O. I. Yarovaya²

¹State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

²N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS

E-mail: nadenkaand100@mail.ru

Аннотация

В настоящее время более 37 миллионов людей в мире инфицированы вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1). В Российской Федерации зарегистрировано более 1,3 миллионов ВИЧ-инфицированных человек **. Антиретровирусная терапия (АРВТ) помогает продлить жизнь ВИЧ-инфицированным людям и улучшить ее качество, а также препятствует дальнейшему распространению вируса в популяции, предотвращая новые случаи инфицирования. Ингибиторы проникновения — относительно новый класс препаратов, чей механизм действия обусловлен препятствием проникновения вируса в клетку-мишень. Разработка препаратов — ингибиторов проникновения — перспективное направление разработки новых антиретровирусных препаратов.

© Н. Б. Рудомётова, Н. С. Щербакова, Д. Н. Щербаков, Л. И. Карпенко, А. С. Соколова, О. И. Яровая, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 19-44-540008.

** URL: <http://www.who.int/>; <http://www.unaids.org/>.

Abstract

Currently, over 37 million people in the world are infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). More than 1.3 million HIV-infected people are registered in the Russian Federation (<http://www.who.int/>; <http://www.unaids.org/>). Antiretroviral therapy (ARVT) helps to prolong the life of people living with HIV and improve its quality, and also prevents the further spread of the virus in the population, preventing new infections. Entry inhibitors are a relatively new class of drugs, whose mechanism of action is due to the obstacle to the penetration of the virus into the target cell. The development of drugs — entry inhibitors — is a promising direction in the development of new antiretroviral drugs.

Псевдовиральные системы широко используются для изучения клеточного тропизма, распознавания рецепторов и механизмов ингибирования вируса, а также для разработки вакцин, получения антител и лекарственных препаратов. Основным достоинством этой системы в случае ВИЧ-1 является возможность использования псевдовирусов, экспонирующих поверхностные белки множества вирусных субтипов, тем самым обеспечивая высокий уровень воспроизводимости результатов.

Цель работы — скрининг соединений на основе терпеноидов с использованием панели псевдовирусов ВИЧ-1 с целью поиска соединений, блокирующих проникновение ВИЧ-1.

В работе была использована международная референсная панель псевдовирусов ВИЧ-1, включающая псевдовирусы подтипов В, С, А/Г, а также региональная панель env-псевдовирусов, включающая варианты ВИЧ-1, циркулирующие на территории РФ (подтип А6, рекомбинантные формы CRF02_AG и CRF63_02A). В качестве тестируемых веществ были использованы производные природных бициклических монотерпеноидов каркасного строения (камфора, борнеол, изоборниламин).

Согласно результатам нейтрализующего анализа перспективной оказалась группа соединений производных изоборниламина: IC50 для производного YaNv-7 составило 60,2–147,9 мкМ. Вещества этой группы показали низкую токсичность (CC50 — 300–666,7 мкМ), при заметной специфической активности. Важно отметить, что производное YaNv-7 способно ингибировать проникновение псевдовирусов подтипов В, С, А6 и рекомбинантной формы CRF63_02A.

Таким образом, показано, что псевдовиральная система ВИЧ-1 может быть использована для поиска перспективных соединений, способных блокировать проникновение псевдовирусов ВИЧ-1 в клетку-мишень.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОМОСОМСПЕЦИФИЧНЫХ
ЗОНДОВ ЙЕМЕНСКОГО ХАМЕЛЕОНА
(*CHAMAELEO CALYPTRATUS*) *

OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF CHROMOSOME-SPECIFIC
PROBES OF THE YEMENI CHAMELEON (*CHAMAELEO CALYPTRATUS*)

А. В. Румянцев, К. В. Тишакова

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет*

A. V. Rumyantsev, K. V. Tishakova

*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

E-mail: magakistian@mcb.nsc.ru

Аннотация

В настоящей работе мы исследуем геном йеменского хамелеона (*Chamaeleo calyptratus*) с использованием хромосомспецифичных библиотек ДНК, что ляжет в основу хромосомной карты этого вида, необходимой для последующих геномных сборок.

Abstract

In this work, we investigate the genome of the Yemeni chameleon (*Chamaeleo calyptratus*) using chromosome-specific DNA libraries, which will form the basis of the chromosome map of this species, which is necessary for subsequent genomic assemblies.

Семейство хамелеоновых включает более 200 видов из Африки и Южной Евразии. Филогенетически хамелеоны близки агамовым и являются частью крупного таксона Pleurodonta. Несмотря на необычное филогенетическое положение, хамелеоновые довольно слабо изучены цитогенетически и пока не вовлечены в геномные исследования. В нашей работе мы получили хромосомспецифичные библиотеки ДНК йеменского хамелеона (*Chamaeleo calyptratus*) ($2n = 24$) с помощью проточного сортирования и охарактеризовали их.

© А. В. Румянцев, К. В. Тишакова, 2020

* Работа поддержана грантом РФФИ № 19-54-26017.

Из одиннадцати библиотек только одна содержала две пары микрохромосом, тогда как остальные содержали по одной хромосоме каждая. Мы планируем использовать полученные библиотеки для секвенирования и анализа их генного содержания. Полученные данные позволят включить представителей хамелеоновых в сравнительные исследования геномов рептилий.

**ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОНКОМАРКЕРА NFATc1
МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ
ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ**

**VISUALIZATION OF THE NFATc1 ONCOMARKER
BY ATOMIC FORCE SPECTROSCOPY FOR DIAGNOSTIC PURPOSES**

Т. А. Садовская¹, Ю. Д. Иванов², Е. Ю. Смирнова¹

*¹Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина*

²Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича

T. A. Sadovskaya¹, Yu. D. Ivanov², E. Y. Smirnova¹

*¹Moscow State Academy of Veterinary
Medicine and Biotechnology of K.I. Scriabin*

²V. N. Orekhovich Institute of biomedical chemistry

E-mail tatana123@mail.ru

Аннотация

Онкомаркер NFATc1 выполняет ключевую роль в антиген-зависимой пролиферации Т-лимфоцитов. С помощью атомно-силовой спектроскопии был исследован размер этого белка. Белок NFATc1 нековалентно сорбировался на поверхности подложки из свежесколотой слюды в виде плотных объектов диаметром от 1 до 3 нм. Результаты сканирования всех данных позволили построить распределение визуализированных объектов. Всего обработано 855 объектов. Выявлено два основных пика высотой 1 и 1,8 нм. Высота визуализируемых объектов соответствует молекулярной массе белка NFATc1 — 24 кДа.

Abstract

The NFATc1 tumor marker plays a key role in antigen-dependent proliferation of T-lymphocytes. The size, physical characteristics and chemical purity of this protein were investigated using atomic force spectroscopy. The NFATc1 protein non-covalently bound to the surface of the freshly cleaved mica substrate in the form of dense objects with diameters ranging from 1 nm to 3 nm. The results of scanning all the data made it possible to construct the distribution of the rendered objects. A total of 855 objects were processed. There were two main peaks 1 nm and 1,8 nm high. The height of the visualized objects corresponds to the molecular weight of the NFATc1 protein — 24 kDa.

Дальнейшее успешное развитие медицинской диагностики на ранней стадии заболеваний требует разработки и внедрения более чувствительных методов анализа белков в биологических жидкостях по сравнению с традиционным иммуноферментным анализом. Белок NFATc1 — один из ключевых факторов, инициирующих транскрипцию гена интерлейкина-2 и, в дальнейшем, пролиферацию Т-лимфоцитов. Экспрессия этого белка в клетках индуцируется при стимуляции мембранных рецепторов антигенами.

Для оценки размеров молекул белка NFATc1 был проведен эксперимент по АСМ-визуализации адсорбированного белка NFATc1 на поверхности свежесколотой слюды сорта «мусковит». Белок NFATc1 нековалентно адсорбировался на поверхности подложки в виде компактных объектов размерами от 1 до 3 нм из раствора с концентрацией белка 10^{-6} М.

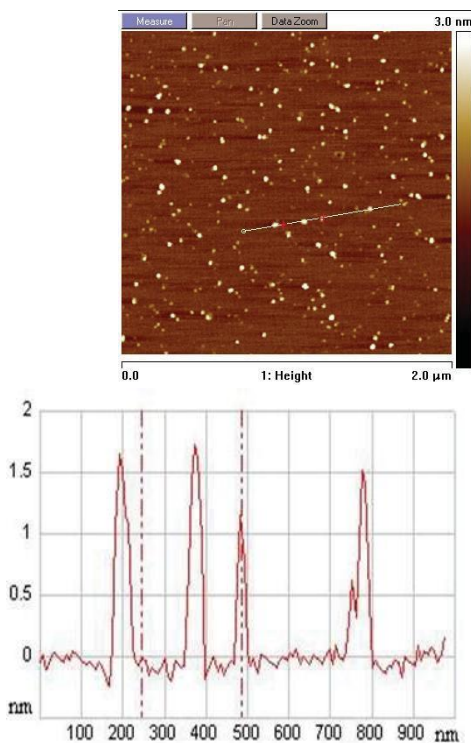


Рис. 1. АСМ изображение поверхности слюды с сорбированными молекулами белка NFATc1 и сечение участка, выделенного маркерной линией. Визуализация поверхности выполнена на ACM Dimension 3100 (VEECO, США).

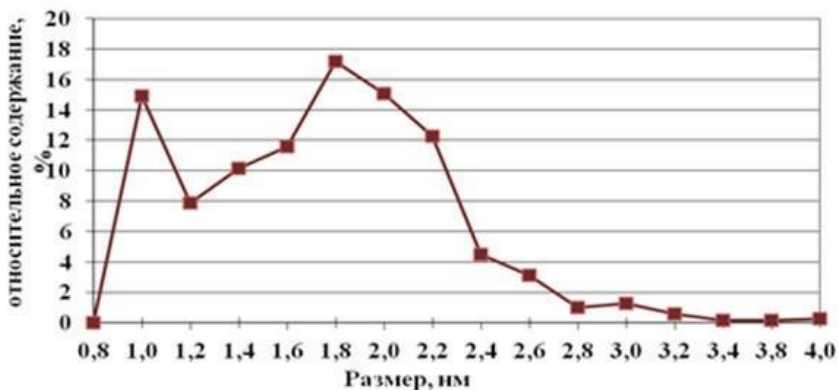


Рис. 2. Результаты обработки АСМ данных:

Распределение визуализированных объектов по высотам

Результаты обработки данных сканирования позволили построить распределение всех визуализированных объектов по размерам. Высота этих объектов составила от 1 до 3,2 нм, выделены два основных пика — с высотами 1 и 1,8 нм.

Полученные данные свидетельствуют о том, что белок NFATc1 адсорбирован как в мономерной форме (соответствует максимальной высоте объектов 1 нм), так и в олигомерной форме (максимальная высота объектов составляет 1,8 нм). Высота визуализированных объектов соответствует молекулярной массе белка NFATc1 — 24 кДа.

ПРОТЕОМНЫЙ СТРЕСС-ОТВЕТ РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЕЙ ТЕЛА
ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД
EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS НА ВОЗДЕЙСТВИЕ
АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ *

PROTEOMIC STRESS-RESPONSE OF DIFFERENT BODY PARTS
OF BAIKAL ENDEMIC AMPHIPODS *EULIMNOGAMMARUS*
VERRUCOSUS TO ABIOTIC STRESS FACTORS

А. Е. Саранчина, Д. С. Бедулина

Институт биологии, Иркутский государственный университет

A. E. Saranchina, D. S. Bedulina

Institute of Biology, Irkutsk State University

E-mail: daria.bedulina@gmail.com

Аннотация

У эндемичных байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* оценивали изменение белкового состава и накопление Бтш70 в мышцах, пищеварительной системе и головном сегменте при воздействии гипертермии, гипоксии и раствора хлорида кадмия. Наиболее выраженным оказался стресс-ответ протеома пищеварительной системы. Повышение содержания Бтш70 было сильнее при воздействии кадмия, чем при других стрессорах.

Abstract

Changes in protein composition and Hsp70 level were estimated in muscles, head, and digestive system of Baikal endemic amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* under heat shock, hypoxia and cadmium chloride exposure. The digestive system demonstrated the most prominent response. Cadmium caused the highest accumulation of Hsp70 in all tissues among the treatments.

Озеро Байкал, древнейшее озеро на Земле, населено эндемичной, холодолюбивой и чувствительной к изменениям окружающей среды фауной.

© А. Е. Саранчина, Д. С. Бедулина, 2020

* Исследование поддержано совместным грантом РФФИ и ассоциации им. Гельмгольца № 18-44-06201.

В свете возрастающей антропогенной нагрузки на озеро и ускоренного изменения климата становится актуальным развитие методов экологического мониторинга. Современные методы молекулярной экологии позволяют оценить потенциал гидробионтов при резком изменении состояния окружающей среды и спрогнозировать состояние экосистем.

Целью исследования явилась оценка изменений белкового состава в различных сегментах тела байкальских эндемичных амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* Gerstf. при воздействии абиотических стрессовых факторов — гипертермии, гипоксии и интоксикации хлоридом кадмия.

Амфипод отлавливали в литорали южного Байкала и акклимировали к лабораторным условиям. Рачков быстро препарировали на льду, после чего спинную мышцу, головной сегмент и кишечник с отростками гепатопанкреаса фиксировали в жидком азоте. Препарирование осуществляли в контрольной и тестовой группе после экспозиции в условиях острого температурного шока (1 ч, LT50) с последующим восстановлением (3 ч), гипоксии (6 ч, 3 мг/л O₂) и хлорида кадмия (24 ч, LC10). Изменения в протеоме оценивали методом двумерного электрофореза. Содержание Бтш70 оценивали методом вестерн-блоттинга.

На электрофореграммах отмечали снижение оптической плотности большого количества белковых пятен после гипертермии. Гипоксия вызывала появление на гелях ряда низкомолекулярных (около 25 кДа) пятен в кислой области. Воздействие хлорида кадмия отражалось на размере пятна, соответствующего Бтш70, чего не наблюдалось при других стрессовых воздействиях. Наибольшую лабильность проявил протеом пищеварительных органов *E. verrucosus*: отмечали достоверные изменения в составе белков при воздействии всех стрессоров.

Хлорид кадмия вызывал наиболее значительное увеличение содержания Бтш70 по сравнению с температурным и гипоксическим воздействием во всех исследованных органах и тканях.

Результаты исследования позволяют оценить целесообразность применения разных частей амфипод для выявления стресс-специфичных биомаркеров на уровне протеома.

**DDX3 РНК ХЕЛИКАЗА В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ
МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ:
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ПРИ МИРНК-ОПОСРЕДОВАННОМ ПОДАВЛЕНИИ
ЭКСПРЕССИИ DDX3 *IN VITRO* И *IN VIVO* ***

DDX3 RNA HELICASE AS THE PROMISING TARGET
FOR CANCER THERAPY: COMPARATIVE
TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF RNAI-MEDIATED
DOWNREGULATION OF DDX3 *IN VITRO* AND *IN VIVO*

О. В. Сергеева¹, Р. С. Ялчина¹, Т. А. Приказчикова¹, Т. О. Абакумова¹,
И. И. Курочкин¹, Т. С. Зацепин^{1,2}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

O. V. Sergeeva¹, R. S. Ialchina¹, T. A. Prikazchikova¹, T. O. Abakumova¹,
I. I. Kurochkin¹, T. S. Zatsepin^{1,2}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

² Lomonosov Moscow State University

E-mail: o.sergeeva@skoltech.ru

Аннотация

DDX3 является мультифункциональным белком, участвующим в регуляции различных аспектов РНК метаболизма: транскрипции, трансляции, сплайсинга, транспорта и деградации РНК. Все эти свойства делают хеликазу DDX3 привлекательной мишенью для терапии онкологических и вирусных заболеваний. Мы использовали метод РНК-интерференции для ингибирования хеликазы DDX3 *in vitro* и *in vivo* в печени мыши с целью описания всех функций и биологических путей, в которых участвует РНК-хеликаза. Нами были отобраны две миРНК с различной эффективностью и определены условия ингибирования РНК хеликазы DDX3 *in vitro* и *in vivo*. Мы провели сравнительный анализ профилей изменения экспрессии генов *in vitro* и *in vivo* и обнаружили значимые отличия. Снижение уровня РНК хеликазы DDX3 *in vitro* в первую очередь влияет на клеточный цикл и трансляцию, тогда как *in*

© О. В. Сергеева, Р. С. Ялчина, Т. А. Приказчикова, Т. О. Абакумова, И. И. Курочкин, Т. С. Зацепин, 2020

* Финансирование исследования: РФФ 19-74-00119.

in vivo основные изменения происходят в процессах ДНК рекомбинации и репарации повреждений ДНК. Также нами показано, что в зависимости от уровня экспрессии хеликазы DDX3 наблюдаются различные фенотипы гепатоцитов *in vivo*, а также меняется вероятность появления апоптотических клеток. Полученные данные важны при валидации РНК хеликазы DDX3 в качестве терапевтической мишени.

Abstract

DDX3 is a multifunctional protein involved in regulation of RNA metabolism, including transcription, translation, splicing, RNA transport, and RNA degradation [Y. Ariumi et al, 2014]. All these features make helicase DDX3 a perspective target for the treatment of cancers and viral diseases. We used RNAi-mediated inhibition of DDX3 *in vitro* and *in vivo* in the mouse liver to uncover and compare DDX3-dependent pathways. We selected two siRNAs with different efficacy and defined the conditions of the DDX3 knockdown *in vitro* and *in vivo* analysis. Comparison of gene expression profiles after DDX3 downregulation showed significant differences between *in vitro* and *in vivo* data. Depletion of DDX3 RNA helicase *in vitro* primarily affected the cell cycle and translation process, whereas *in vivo* main changes occur during DNA recombination and DNA damage reparation. We also demonstrated that phenotype distribution of hepatocytes and portion of apoptotic cells depends on the level of DDX3 helicase *in vivo*. The obtained data should be taken into account during validation of DDX3 RNA helicase as a therapeutic target.

В результате анализа транскриптомных данных после подавления экспрессии хеликазы DDX3 были обнаружены изменения в экспрессии 107 генов *in vitro*, тогда как *in vivo* изменения экспрессии отличались — от 66 генов на 6-й день после подавления DDX3 до 155 генов на 13-й день. Можно выделить как общие изменения в биологических путях для *in vitro* и *in vivo* (снижение метаболизма жирных кислот, ксенобиотиков), так и отличающиеся процессы. На на 6-й день после подавления DDX3 *in vivo* изменения лучше коррелируют с данными *in vitro*, тогда как после 13 дней подавления DDX3 *in vivo* наблюдаются признаки воспаления, что приводит к изменению многих биологических процессов в печени.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ AS3MT, PECR И MUC7 В УВЕЛИЧЕНИИ
ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ****POLYMORPHISM OF AS3MT, PECR, AND MUC7 GENES IN INCREASING
THE PROBABILITY OF ALCOHOLIC DEPENDENCE**Е. В. Снытков¹, В. Н. Кипень²¹*Международный государственный экологический институт
им. А. Д. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь*²*Институт генетики и цитологии НАН РБ, Минск, Республика Беларусь*E. V. Snytkov¹, V. N. Kipen'²¹*International Sakharov Environmental Institute
of Belarusian State University, Minsk, Belarus*²*Institute of Genetics and Cytology NAS, Minsk, Belarus*

E-mail: evsnytkov@gmail.com

Аннотация

Алкоголизм — хроническое заболевание, которое характеризуется пристрастием к алкоголю с психической и физиологической зависимостью от него. Нами изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов ряда неклассических для данной патологии генов у лиц, страдающих от алкогольной зависимости, и у лиц из группы сравнения. Генетическими маркерами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости, являются: генотип GG (rs7085104, AS3MT), генотип GG (rs7590720, PECR) и аллель A (rs1109501, MUC7).

Abstract

Alcoholism is a chronic disease characterized by an addiction to alcohol with mental and physiological dependence on it. We have studied the frequency distribution of alleles and genotypes of polymorphic variants of a number of genes that are not classical for this pathology in persons suffering from alcohol dependence and in persons from the comparison group. Genetic markers associated with an increased likelihood of developing alcohol dependence are: GG genotype (rs7085104, AS3MT); GG genotype (rs7590720, PECR); allele A (rs1109501, MUC7).

Введение

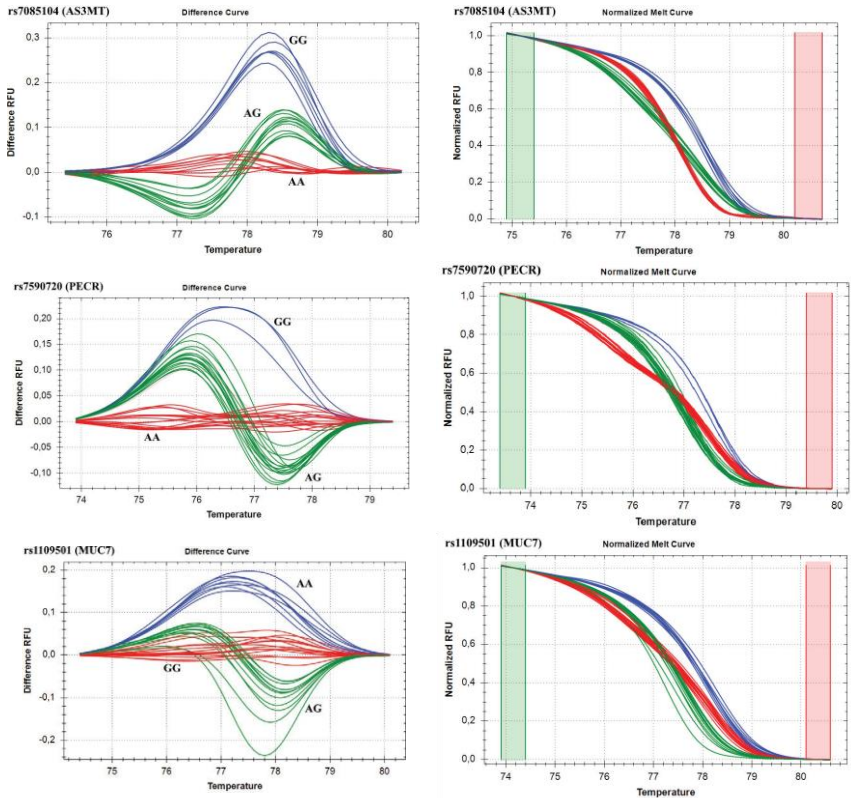
Алкогольная зависимость имеет ряд социальных проявлений, таких как высокий уровень смертности, снижение уровня жизни людей, непреднамеренные травмы, криминальное поведение, дорожно-транспортные происшествия, суицид и др. В настоящее время дискутируются две основные гипотезы: первая — генетический фактор развития алкогольной зависимости обусловлен совокупным влиянием множества низко- и среднепенетрантных генов, каждый из которых обладает незначительным эффектом по отдельности; вторая — наибольший вклад в развитие алкогольной зависимости оказывает небольшое число высокопенетрантных генов. Наша работа придерживается первой гипотезы.

Материалы и методы

Данное исследование проведено по типу случай-контроль и включает 353 добровольца, постоянно проживающих на территории Республики Беларусь, для 142 из которых клинически установлена алкогольная зависимость (основная группа), в то время как 211 человек не имели пристрастия к спиртосодержащим веществам (группа сравнения). Группа сравнения по основным демографическим критериям (пол, возраст, социальный статус и пр.) соответствовала основной группе. Генотипирование по полиморфным вариантам rs7085104 (*AS3MT*), rs7590720 (*PECR*) и rs1109501 (*MUC7*) проводилось с использованием технологии плавления ампликона высокого разрешения (HRM — high resolution melting) на термоциклере в режиме реального времени CFX96 Touch (Bio-Rad). Валидация полученных результатов осуществлена с использованием метода ПЦР-ПДРФ.

Результаты

Генетическими маркерами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости, оказались: генотип GG (rs7085104, *AS3MT*) — ОШ = 1,76 [95 % ДИ = (1,02–3,03)], $p = 0,0490$; генотип GG (rs7590720, *PECR*) — ОШ = 2,53 [95 % ДИ = (1,27–5,03)], $p = 0,0080$; аллель А (rs1109501, *MUC7*) — ОШ = 1,92 [95 % ДИ = (1,39–2,65)], $p < 0,0001$.



Для данных полиморфизмов имеется связь с шизофренией, алкоголизмом, расстройствами аутистического спектра, поэтому полученные нами результаты будут способствовать дальнейшему поиску и анализу общих генетических компонент для аддиктивных заболеваний, включая алкогольную зависимость.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *EPHX2*, *MUC7* И *DGKI*
В УВЕЛИЧЕНИИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ**

**POLYMORPHISM OF *AS3MT*, *PECR*, AND *MUC7* GENES
IN INCREASING THE PROBABILITY
OF DRUG DEPENDENCE DEVELOPMENT**

Е. В. Снытков¹, В. Н. Кипень²

¹*Международный государственный экологический институт
им. А. Д. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь*

²*Институт генетики и цитологии НАН РБ, Минск, Республика Беларусь*

E. V. Snytkov¹, V. N. Kipen'²

¹*International Sakharov Environmental Institute
of Belarusian State University, Minsk, Belarus*

²*Institute of Genetics and Cytology NAS, Minsk, Belarus*

E-mail: evsnytkov@gmail.com

Аннотация

Наркотическая зависимость представляет собой хроническое заболевание, для которого характерны множественные рецидивы, характеризуется постоянным влечением к употреблению наркотических веществ, часто сопровождается психическими и соматическими расстройствами. По нашим данным, генетическими маркерами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости, являются rs73229090 (*EPHX2*), rs1109501 (*MUC7*), rs3735025 (*DGKI*).

Abstract

Drug addiction is a chronic disease, which is characterized by multiple relapses, is characterized by a constant craving for the use of drugs, often accompanied by mental and somatic disorders. According to our data genetic markers associated with an increased likelihood of alcohol dependence are rs73229090 (*EPHX2*), rs1109501 (*MUC7*), rs3735025 (*DGKI*).

Введение

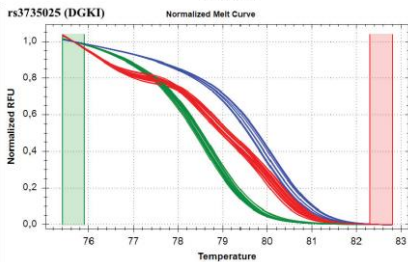
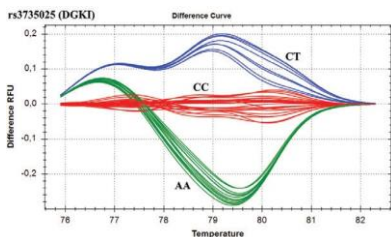
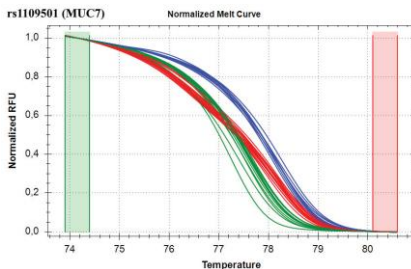
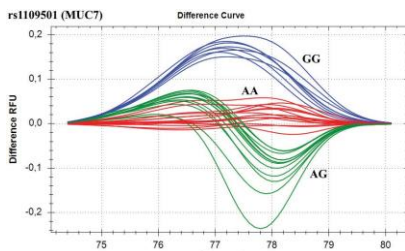
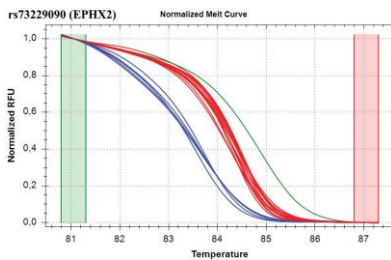
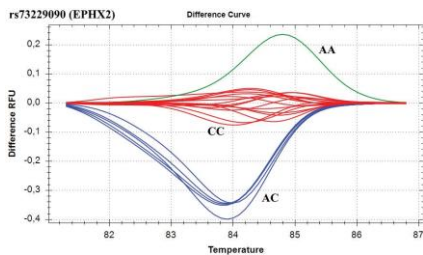
Наркотическая зависимость — это хроническое заболевание, характеризующееся навязчивым поиском и употреблением наркотиков, которое трудно контролировать, несмотря на пагубные последствия. Первоначальное решение о приеме наркотиков является добровольным для большинства людей, но повторное употребление наркотиков может привести к изменениям мозга, которые бросают вызов самоконтролю зависимого человека и мешают его способности противостоять сильному побуждению к употреблению наркотиков. Эти изменения мозга могут быть стойкими, поэтому наркомания считается «рецидивирующим» заболеванием — люди, выздоравливающие от расстройств, связанных с употреблением наркотиков, подвергаются повышенному риску возвращения к употреблению наркотиков даже после многих лет отсутствия их приема.

Материалы и методы

Данное исследование проведено по принципу случай-контроль и включает 332 добровольца, постоянно проживающих на территории Республики Беларусь, для 121 из которых клинически установлена наркотической зависимости (основная группа), в то время как 211 человек не имели пристрастия к наркотическим веществам (группа сравнения). Группа сравнения по основным демографическим критериям (пол, возраст, социальный статус и пр.) соответствовала основной группе. Генотипирование по полиморфным вариантам rs73229090 (*EPHX2*), rs1109501 (*MUC7*) и rs3735025 (*DGKI*) проводилось с использованием технологии плавления ампликона высокого разрешения (HRM — high resolution melting) на термоциклере в режиме реального времени CFX96 Touch (Bio-Rad). Валидация полученных результатов осуществлена с использованием метода ПЦР-ПДРФ.

Результаты

Генетическими маркерами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости, являются: аллель А по полиморфизму rs1109501 (*MUC7*) — ОШ = 1,54 [95 % ДИ = (1,03–2,17)], $p = 0,0100$; генотипы СС/СТ по полиморфизму rs3735025 (*DGKI*) — ОШ = 2,12 [95 % ДИ = (1,30–3,46)], $p = 0,0030$; генотип А/А по полиморфизму rs73229090 (*EPHX2*) — ОШ = 12,49 [95 % ДИ = (0,64–243,96)], $p = 0,0480$.



Выявление лиц с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости на основе молекулярно-генетического анализа является современным подходом в борьбе с данной патологией, так как позволяет своевременно провести комплекс профилактических мероприятий.

АТФазы *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* **CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* ATPases

Ю. В. Сорокина, И. Н. Рыболовлев, Д. И. Тартаковская, Ю. Ф. Белый

Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

Yu. V. Sorokina, I. N. Rybolovlev, D. I. Tartakovskaya, Y. F. Belyi

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology
named after N. F. Gamaleya, Moscow

E-mail: luvason@gmail.com

Аннотация

Впервые клонированы гены *virB4* и *virD4* *Clostridioides difficile*, сконструированы штаммы *Escherichia coli*, экспрессирующие данные нуклеотидные последовательности, и разработана технология очистки для выделения белков в чистом виде. Очищенные VirB4 и VirD4 образовывали в водных растворах типичные высокомолекулярные олигомеры, обладающие нуклеотид-трифосфатазной активностью (гидролиз АТФ > ГТФ), зависящей от присутствия в реакционной смеси двувалентных катионов и ионов калия и с оптимальной температурой 30–37 °С. VirD4, но не VirB4, проявлял выраженную ДНК-связывающую активность.

Abstract

The genes coding for VirB4 and VirD4 of *Clostridioides difficile* were cloned and expressed in *Escherichia coli*. The corresponding proteins were isolated and characterized biochemically. In water solutions the purified VirB4 and VirD4 produced high-molecular-mass oligomers, which were able to hydrolyze NTPs (ATP preferably to GTP). The enzymatic activity was depended on the presence of divalent cations and K⁺ as the cofactor with the optimal reaction temperature of 30–37 °C. VirD4, but not VirB4, demonstrated DNA-binding activity.

Clostridioides difficile — грамположительная анаэробная палочка, вызывающая воспалительные поражения толстого кишечника человека. Ввиду тяжести заболевания остро стоит вопрос о поиске новых подходов к его терапии, в том числе отборе белков-мишеней, подавление активности ко-

торых привело бы к остановке развития инфекции. В последнее время появились литературные данные о возможности снижения вирулентности патогенных микроорганизмов путем воздействия на секреторные системы IV типа.

Аппарат IV типа секреции является многокомпонентной трансмембранной белковой структурой, участвующей в вирулентности патогенных микроорганизмов и необходимой для транспорта белков и нуклеиновых кислот из бактериальной клетки в окружающую среду. В его состав, помимо прочих, входят белки-АТФазы, необходимые для функционирования данной системы секреции. Из результатов биоинформационного анализа известно, что геном *C. difficile* кодирует белки, гомологичные АТФамам IV типа секреции *Agrobacterium tumefaciens* — VirB4 и VirD4. Данные белки могут выступать в качестве новых мишеней для подавления развития клостридиальной инфекции, однако работ, посвященных выделению их в чистом виде и исследованию свойств, не проводилось.

Для получения цельноразмерных белков нами были созданы рекомбинантные системы экспрессии с использованием в качестве продуцентов *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium*. Наибольшей продукцией целевых белков характеризовались *B. megaterium*. Однако даже в этой экспрессирующей системе получить препаративные количества белков для их биохимического анализа не удавалось ввиду их низкой продукции. Поэтому было принято решение получить отдельно ферментативные домены белков после замены гидрофобных NH₂-концевых областей на гетерогенные пептиды, облегчающие дальнейшую очистку и/или способствующие лучшей растворимости препаратов (6His-, GST-, MBR-тэги). Наилучшие результаты были получены с использованием целевых препаратов, содержащих в качестве тэга MBR (мальтозо-связывающий белок). Было установлено, что VirB4 и VirD4 *C. difficile* образуют олигомеры с молекулярной массой около 1 мД. Белки гидролизovali преимущественно АТФ, но не ГТФ. АТФазная активность зависела от присутствия в реакционной среде солей двувалентных металлов (в первую очередь, Mg²⁺) и ионов калия. Температура инкубации 30–37 °С являлась оптимальной для реакции. VirD4 обладал ДНК-связывающей способностью. При этом данная АТФаза взаимодействовала не только с хромосомной, но и с плазмидной двуцепочечной ДНК. Интересно, что ионы Mg²⁺ усиливали ДНК-связывающую активность, но в меньшей степени, чем Mn²⁺, Co²⁺ и Ca²⁺. Результаты ДНК-связывающей активности VirD4 указывают на роль предполагаемого аппарата IV типа секреции *C. difficile* в генетическом обмене у бактерий.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ
САРКОМЫ ЮИНГА**

**THE STUDY ON THE EFFICIENCY OF THE USE OF MOLECULAR-
GENETIC METHOD FOR DIAGNOSIS OF EWING'S SARCOMA**

К. В. Субботина

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

K. V. Subbotina

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

E-mail: kristina_sybot@mail.ru

Аннотация

Саркома Юинга является одной из самых агрессивных злокачественных опухолей детского возраста, которая чаще всего поражает костную ткань. На данный момент существует определенная сложность проведения дифференциальной диагностики саркомы Юинга с другими опухолями. Поэтому нами была поставлена задача разработать и исследовать молекулярно-генетический метод диагностики саркомы Юинга, основанный на обнаружении химерных транскриптов с помощью Real-Time PCR, который позволит наиболее точно и своевременно выявлять опухоль.

Abstract

Ewing's sarcoma is one of the most aggressive malignant tumors of childhood, which most often affects bone tissue. At the moment, there is a certain difficulty in differential diagnosis of Ewing's sarcoma with other tumors. Therefore, we set the task to develop and study a molecular genetic method for diagnosing Ewing's sarcoma, based on the detection of chimeric transcripts using Real-Time PCR, which will allow the most accurate and timely detection of the tumor.

Саркома Юинга (СЮ) представляет собой остеолитическое злокачественное новообразование, которое отличается крайне быстрым рас-

пространением метастазов. В основе патогенеза СЮ лежит хромосомная транслокация, в результате которой ген EWSR1 сливается с генами семейства ETS. Данная перестройка приводит к экспрессии химерного онкопротеина EWSR1-ETS, который участвует в регуляции транскрипции некоторых генов. Обнаружение одного из нескольких патогномичных химерных транскриптов является золотым стандартом диагностики.

В основном данное изменение генома детектируется с помощью метода FISH гибридизации. Для повышения информативности метода требуется проведение множественных гибридизаций, поэтому к одному из его недостатков относится моноплексность, то есть возможность выявления только одного транскрипта с помощью одной гибридизационной пробы. Поэтому сейчас на первый план выходят такие методы, как Real-Time PCR, значительным преимуществом которой является мультиплексный подход. С помощью введения в практику данного метода становится возможной быстрая и точная дифференциальная диагностика СЮ с другими злокачественными новообразованиями.

Таким образом, целью нашей работы стала разработка метода диагностики СЮ на основе выявления химерных транскриптов с помощью Real-Time PCR на препаратах РНК, полученных из фиксированной ткани в парафиновых блоках.

В ходе проведенного анализа базы данных Cosmic было обнаружено, что наиболее часто встречающимися транскриптами являются EWSR1-FLI (60,46%), EWSR1-ATF1 (8,32%), EWSR1-ERG (5,22%), EWSR1-CREB1 (1,15%). С помощью программы Vector NTI был выполнен дизайн систем олигонуклеотидных праймеров и зондов для дальнейшего выявления наиболее часто встречаемых транскриптов гена EWSR1. Также было проведено клонирование участков выбранных олигонуклеотидных последовательностей с использованием плазмидного вектора pBlueScript II SK(+) с дальнейшей возможностью использования их в качестве контрольных ДНК и РНК.

В результате выполненной работы был разработан широкодоступный метод диагностики СЮ на основе выявления химерных транскриптов с помощью Real-Time PCR. С использованием данного метода был осуществлен поиск молекулярных перестроек в предоставленных 40 образцах СЮ. Самой распространенной перестройкой являлась EWSR1/FLI (15). Перестройки EWSR1/ATF1 (10), EWSR1/ERG (5), EWSR1/CREB1 (1) встречались значительно реже, что сопоставимо с данными литературы.

ПОДХОДЫ ХЕМО- И БИОИНФОРМАТИКИ ДЛЯ
ВИРТУАЛЬНОГО СКРИНИНГА ПРАКТИЧЕСКИ
ВАЖНЫХ СВОЙСТВ ДВУХЪЯДЕРНЫХ БИСТИАЗОЛ-
И БИСТИАДИАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ АМИНОВ *

THE CHEM- AND BIOINFORMATICS METHODS
FOR VIRTUAL SCREENING OF PRACTICALLY IMPORTANT
PROPERTIES OF BINUCLEAR BISTHIAZOLE-
AND BISTHIADIAZOLE-CONTAINING AMINES

Ю. В. Суворова, Е. А. Петухова

Ивановский государственный химико-технологический университет

Yu. V. Suvorova, E. A. Petukhova

Ivanovo State University of Chemistry and Technology

E-mail: yuliya_butina@mail.ru

Аннотация

Современная фармацевтическая химия требует быстрого поиска новых антибактериальных и противовирусных препаратов. Синтез новых лекарственных соединений — это достаточно продолжительный процесс. Для сокращения временных затрат разработаны различные компьютерные программы, позволяющие по структурной формуле соединения спрогнозировать его свойства. В настоящей работе обсуждаются спектры биологической и антибактериальной активностей бистиазолов и бистиадиазолов, полученные с использованием онлайн-доступных ресурсов PASS и Anti-Bac-Pred.

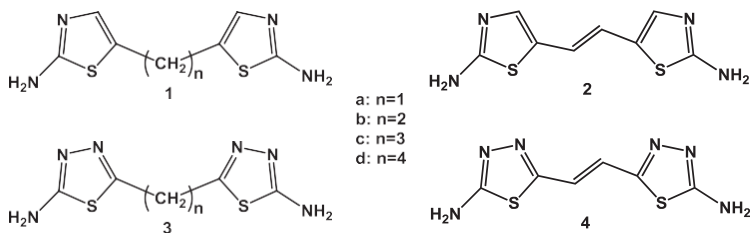
Abstract

The contemporary pharmaceutical chemistry requires a quick search of new antibacterial and antiviral drugs. The synthesis of new medicinal compounds is a rather extended process. To decrease the time required, various computer programs have been developed that allow predicting the properties of the compound using the structural formula. This work discusses the biological and antibacterial activities spectra of bisthiazoles and bistiadiazoles obtained using the online resources PASS and Anti-Bac-Pred.

© Ю. В. Суворова, Е. А. Петухова, 2020

* Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ МК-1396.2020.3.

В качестве объектов исследования в данной работе выбраны гетероциклические соединения, содержащие в своем составе два 1,3-тиазольных или два 1,3,4-тиадиазольных цикла, связанных различными спейсерами, такими как метил, этил, этенил, пропил, бутил (см. рисунок).



Структуры исследованных соединений

Прогноз биологической активности, выполненный с использованием программы PASS [1], показал, что на потенциально проявляемые свойства оказывает влияние не только природа гетероциклического фрагмента, но и характер спейсера. Так, молекула **1a** с вероятностью 98,6 % может являться антагонистом фактора роста инсулина, молекулы **1b–d**, **2** могут проявлять свойства ингибитора карбоксипептидазы, причем вероятность этого уменьшается от 86,5 до 84,2 % в ряду **1b** > **2** > **1c** > **1d**. Соединения **3a**, **3b** и **4** с большой вероятностью могут выступить в роли ингибиторов АТФ-азы, в то время как **3c** может быть использован как антидиабетик, а **3d** — в качестве мукомебранного протектора, который выполняет защитную функцию слизистых оболочек организма.

Анализ спектров антибактериальных свойств, полученных посредством программы Anti-Bac-Pred [2], показал, что бистиазолы (**1a–d**, **2**) гипотетически могут обладать антибактериальной активностью по отношению к грамположительным бактериям *Clostridium ramosum*, т. е. потенциально могут использоваться для восстановления микрофлоры кишечника и лечения дисбактериоза. Бистиадиазолы (**3a–d**, **4**) с вероятностью 60–63 % могут проявить противомикробную активность по отношению к грамотрицательному штамму бактерий *Shigella sp.*, причем увеличение длины алкильного спейсера способствует снижению активности.

Литература

1. Поройков В. В. и др. Компьютерное предсказание биологической активности химических веществ: виртуальная хемогеномика // Вестник ВОГиС. 2009. № 1(13). С. 137–143.
2. Filimonov D. A. et al. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitation//Biomed. Chem.: Research and Methods. 2018. Vol. 1(1). P. 1–21.

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СТАРЫХ КРЫС *

THE EFFECT OF LONG-TERM CHEMOTHERAPY ON THE LOCOMOTOR ACTIVITY OF ELDERLY RATS

А. В. Суховских^{1,2}, О. П. Молодых¹, В. С. Ушаков¹, М. О. Политко¹,
Д. К. Соколов¹, Е. В. Колдышева¹, Е. В. Григорьева^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

A. V. Suhovskih^{1,2}, O. P. Molodykh¹, V. S. Ushakov¹, M. O. Politko¹,
D. K. Sokolov¹, E. V. Koldysheva¹, E. V. Grigorieva^{1,2}

¹Federal Research Center of Fundamental
and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

E-mail: anastasia-suhovskih@mail.ru

Аннотация

Работа посвящена изучению влияния противоопухолевого препарата темозоломида на двигательную активность и структуру эпифизарного хряща коленных суставов старых крыс. Показано, что длительное применение препарата приводит к снижению двигательной активности, что сопровождается дегенеративными изменениями эпифизарного хряща большеберцовой кости.

Abstract

The work is devoted to the study of the effect of the antitumor drug temozolomide on the locomotor activity and on the structure of the elderly rats knee joints cartilage. It has been shown that long-term use of the drug leads to a decrease in locomotor activity which is associated with degenerative changes in the tibial epiphyseal cartilage.

© А. В. Суховских, О. П. Молодых, В. С. Ушаков, М. О. Политко, Д. К. Соколов, Е. В. Колдышева, Е. В. Григорьева, 2020

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ (проект № 19-75-00051). А. В. Суховских поддержана стипендией Президента Российской Федерации (СП-1816.2019.4).

Противоопухолевый цитостатический препарат темозоломид (ТМЗ) является стандартным для проведения химиотерапии злокачественных глиом и метастатических меланом. Использование ТМЗ имеет множество побочных эффектов, однако недостаточно изученным остается вопрос об ухудшении двигательных навыков пациентов после длительной терапии ТМЗ. Целью данной работы являлось изучение влияния ТМЗ на двигательную активность крыс Wistar и структуру эпифизарного хряща коленных суставов животных.

Для изучения эффектов препарата здоровым 9-месячным крысам перорально вводили ТМЗ (150 мг/м²) в течение 4 месяцев. Животные получали 5 циклов ТМЗ по 5 дней подряд с перерывами в 16 дней между циклами. Двигательная активность (количество пересеченных квадратов и вертикальных стоек) животных до и после применения ТМЗ была оценены в тесте «открытое поле». Парафиновые срезы коленных суставов были окрашены гематоксилином и эозином для оценки морфологических изменений и морфометрии. Для детекции общих и сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ) срезы были окрашены альциановым синим.

Было показано, что ТМЗ снижает горизонтальную двигательную активность животных по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$), и изменения двигательной активности сопровождаются разрывами и разволокнениями, затрагивающим пролиферативную зону и зону зрелого хряща бедренной и большеберцовой кости. Кроме того, введение ТМЗ приводило к значительным изменениям в высоте зон эпифизарного хряща большеберцовой кости, а именно к увеличению высоты зоны молодых хондроцитов в 4 раза ($p < 0,01$), снижению высоты зоны созревания в 1,5 раза ($p < 0,01$) и уменьшению средней толщины эпифизарного хряща большеберцовой кости 2 раза ($p < 0,001$). Также введение ТМЗ приводило к увеличению содержания тотальных ГАГ в матриксе хряща и уменьшению количества сульфатированных ГАГ в хондроцитах.

Таким образом, ТМЗ снижает двигательную активность взрослых животных, оказывая негативное влияние на их моторные функции. Одним из механизмов такого эффекта может быть нарушение структуры эпифизарного хряща коленного сустава и количества ГАГ, что требует осторожности при назначении ТМЗ пожилым пациентам и разработки вспомогательных протекторных препаратов, снижающих побочные эффекты на суставы.

HSP90 КАК ДОЛГОСРОЧНЫЙ БУФЕР МУТАЦИОННОГО ГРУЗА ***HSP90 AS A LONG-TERM BUFFER OF MUTATIONAL BURDEN**

В. Н. Тимонина ¹, А. Д. Сокол ¹, Д. А. Кнорре ²,
Е. О. Третьяков ³, К. В. Гунбин ⁴, К. Ю. Попадьян ^{1,5}

¹Балтийский федеральный университет
им. Иммануила Канта, Калининград

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

³Медицинский университет Вены

⁴Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

⁵Федеральная политехническая школа Лозанны

V. N. Timonina ¹, A. D. Sokol ¹, D. A. Knorre ²,
E. O. Tretiakov ³, K. V. Gunbin ⁴, K. Y. Popadin ^{1,5}

¹*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*

²*Lomonosov Moscow State University*

³*Medical University of Vienna*

⁴*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

⁵*Ecole Polytechnique Federale de Lausanne*

Email: valeratimonina@gmail.com

Аннотация

Белки теплового шока играют важную роль в белковом гомеостазе клеток, поддерживая правильную конформацию поврежденных белков. Несколько доказательств предполагают роль hsp90 в буферизации мутационного груза у модельных организмов. В данном проекте мы выдвигаем гипотезу о том, что hsp90 может действовать как долгосрочный буфер груза мутаций, влияя на эволюцию видов. Для доказательства данной гипотезы мы используем межвидовое сравнение экспрессионных и геномных данных.

© В. Н. Тимонина, А. Д. Сокол, Д. А. Кнорре, Е. О. Третьяков, К. В. Гунбин, К. Ю. Попадьян, 2020

* This work has been supported by the 5 Top 100 Russian Academic Excellence Project at the Immanuel Kant Baltic Federal University, by the Russian Foundation for Basic Research grant 18-29-13055.

Abstract

Heat shock proteins play an important role in protein homeostasis of cells maintaining the correct folding of disturbed proteins. Several lines of evidence suggest the role of hsp90 in buffering mutational burden in model organisms. Here we propose a hypothesis that hsp90 may act as a long-term buffer of mutational load influencing species evolution. To prove the hypothesis we use interspecies comparison of expression and genomic data.

Heat shock proteins (hsp) maintain optimal folding of their clients - proteins, affected by environmental (temperature) or genetic (a load of slightly deleterious mutations) perturbations. In several short-term experiments (typically from one to several generations) it has been shown that hsp90 acts as a buffer of the mutational burden influencing the manifestation of slightly-deleterious variants [1, 2, 3, 4]. Here, we propose that hsp90 may also play a long-term evolutionary role compensating, for example, an increased mutational burden in species with low effective population size (N_e). Thus hsp90 might be under stronger evolutionary constraints in low-sized versus high-sized populations.

Taking into account that the number of fixed slightly deleterious nonsynonymous variants is higher in species with low effective population size [5, 6], we expect that the expression level of hsp90 in these species is increased to partially compensate the high burden of slightly-deleterious nonsynonymous variants (SDNVs). Indeed using comparative species expression level data [8] we found out that expression level of hsp90 is the lowest in Macaque, which is characterized by the highest effective population size among other six analyzed [8] primates (N_e of macaque ~80'000, Yuan et al. 2012; human: 13'100-16'200; gorilla: 28'400-56'900; chimp: 30'900-61'800; orangutan: 42'300-84'600, data from [9]).

Analyses of hsp90 expression pattern between different human tissues (the highest in the ovary, GTEX portal *) and different stages of mammalian development (the highest expression is observed at early stages of development when the most essential genes are expressed) [9] is in line with supportive role of hsp90 during the development.

Next, we assumed that because of this potential compensatory role, hsp90 might be under stronger evolutionary constraints in low-sized versus high-sized populations compared to other genes. In order to compare the level of relaxation of hsp90 in different mammalian species, we performed a linear regression analysis with scaling of variables between species-specific K_n/K_s of hsp90 (using only 1-to-1 orthologs of human Hsp90) and species-specific generation length (which approximates the effective population size) of 38 mammalian species. We obtained positive correlation (slope = 0,6906, p-value = 0,0006, $R^2 = 0,021$). In or-

* URL: <https://www.gtexportal.org/>.

der to make the final conclusion about selection relaxation of hsp90 we compared the hsp90 specific slope with slopes of genes that are evolutionary comparable to hsp90. To derive such a subset of genes we performed Principal Component Analysis taking into account evolutionary characteristics of human genes such as the probability of being Loss of Function intolerant, haploinsufficiency [7], etc. as well as structural features like average exon length, gene length, number of transcripts, etc.

We expect that the hsp90-specific slope should be less steep compared to other genes. Across comparable genes, hsp90 has one of the lowest mean Kn/Ks that emphasizes its high level of evolutionary constraints. Moreover, detailed analysis of slopes from linear regression models of Kn/Ks vs Generation length showed a robust signal of the decreased hsp90-specific slope versus the slopes of other genes.

Finally, we analyzed the distribution of cis-eQTLs (GTEx portal *) in hsp90 compared to a subset of similar genes (see the previous section). We observed that hsp90 has a significantly lower proportion of cis-eQTLs that decrease its expression level than in other genes (One-Sample z-test p-value < 2.2e-16). This fact suggests that loss of expression of hsp90 due to its role in homeostasis maintenance should keep a constant expression level and so it has a deficit of regulatory expression variants decreasing its expression level compared to other genes.

Altogether we observed several lines of evidence, confirming the compensatory role of hsp90 but more analyses are needed to confirm its long-term buffering effect.

References

1. Fares M. A., Ruiz-González M. X., Moya A., Elena S. F., Barrio E. GroEL buffers against deleterious mutations // *Nature*. 2002. Vol. 417(6887).P.398.
2. Sangster T. A., Salathia N., Lee H. N., Watanabe E., Schellenberg K., Morneau K., Lindquist S. HSP90-buffered genetic variation is common in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105(8). P.2969–2974.
3. Rutherford S. L., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution // *Nature*. 1998. Vol. 396.6709. P.336.
4. Maisnier-Patin S., Roth J., Fredriksson Å. et al. Genomic buffering mitigates the effects of deleterious mutations in bacteria // *Nat Genet*. 2005. Vol. 37. P. 1376–1379.
5. Popadin K., Polishchuk L. V., Mamirova L., Knorre D., Gunbin K. Accumulation of slightly deleterious mutations in mitochondrial protein-coding genes of large versus small mammals // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104(33), P. 13390–13395.
6. Popadin K. Y., Gutierrez-Arcelus M., Lappalainen T., Buil A., Steinberg J., Nikolaev S. I., Antonarakis S. E. Gene age predicts the strength of purifying selection acting on gene

* URL: <https://www.gtexportal.org/>.

expression variation in humans // *American Journal of Human Genetics*. 2014. Vol. 95(6). P. 660–674.

7. Bartha I., di Iulio J., Venter J. et al. Human gene essentiality // *Nat Rev Genet*. 2018. Vol. 19. P. 51–62. doi.org/10.1038/nrg.2017.75.

8. Brawand D., Soumillon M., Necsulea A., Julien P., Csárdi G., Harrigan P., Albert F. W. The evolution of gene expression levels in mammalian organs // *Nature*. 2011. Vol. 478(7369). P. 343–348.

9. Prado-Martinez J., Sudmant P. H., Kidd J. M., Li H., Kelley J. L., Lorente-Galdos, B., Cagan A. Great ape genetic diversity and population history // *Nature*. 2013. Vol. 499(7459). P. 471–475.

10. Cardoso-Moreira M., Halbert J., Valloton D. et al. Gene expression across mammalian organ development // *Nature*. 2019. Vol. 571. P. 505–509.

СПЛАЙС-ИЗОФОРМЫ MDM2 В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ РАКА ЛЕГКОГО И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА *

SPLICE ISOFORMS OF MDM2 IN CELL MODELS OF LUNG AND BREAST CANCER

Е. К. Тананыкина ¹, М. Пьячентини ², Н. А. Барлев ¹, О. Ю. Шувалов ¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

²Римский университет Тор Вергата

E. K. Tananykina ¹, M. Piacentini ², N. A. Barlev ¹, O. Y. Shuvalov ¹

¹Institute of Cytology RAS, St. Petersburg

²University of Rome Tor Vergata

E-mail: liza.tananykina@gmail.com

Аннотация

Являясь E3-убиквитин лигазой, MDM2 выступает в роли основного негативного регулятора p53. Амплификация гена *MDM2* наблюдается во многих злокачественных образованиях. Более того, в малигнизированных клетках также наблюдается гиперэкспрессия большого числа сплайс-изоформ MDM2. Однако их функции в опухолевых клетках практически не изучены. В данной работе мы исследуем потенциальную биологическую роль наиболее распространенных сплайс-изоформ MDM2: MDM2-A, -B и -C.

Abstract

MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) is well-known as E3-ubiquitin-protein ligase and main negative regulator of p53. *MDM2* amplification is detected in many types of cancer. Moreover, there are a lot of spliced-isoforms of MDM2, which are also overexpressed in malignant cells. However, functions of those proteins in cancer cells are practically not studied. In this study we research the possible biological role of the most common spliced-isoforms in cancer cells: MDM2-A, -B and -C.

Помимо p53, субстратами убиквитин-лигазы MDM2 являются и другие белки-супрессоры опухолей (Rb, E-кадгерин и др.), а также некоторые

известные онкогены (hTert, Snail, Slug). Помимо гиперэкспрессии полноразмерной формы MDM2, во многих опухолях человека наблюдается также экспрессия сплайс-изоформ, наиболее часто обнаруживаемыми из которых являются: MDM2-A (ALT2), MDM2-B (ALT1) и MDM2-C (ALT3).

Мы провели оценку уровня экспрессии эндогенных полноразмерной и сплайс-изоформ MDM2 (A-, -B и -C) при помощи иммуноблоттинга в панели клеточных моделей рака легкого и молочной железы. Мы показали, что клетки данных линий экспрессируют различные уровни как полноразмерной, так и сплайс-изоформ MDM2.

Для выяснения свойств и молекулярных функций сплайс-изоформ MDM2 нами были созданы клеточные линии карциномы молочной железы (SKBR-3) и немелкоклеточной аденокарциномы легкого (H1299, H460) с гиперэкспрессией полноразмерной формы MDM2, сплайс-изоформ (MDM2-A, -B и -C) и «мутантной» формы MDM2 (C464A), которая не обладает убиквитин-лигазной каталитической активностью.

На полученных клеточных линиях мы проводили оценку влияния сплайс-изоформ MDM2 на пролиферативный потенциал раковых клеток путем мониторинга состояния клеток на приборе xCelligence и устойчивость к широко распространенным химиотерапевтическим препаратам: доксорубину, цисплатину, эпоподиду. Полученные данные позволяют судить о различных молекулярно-биологических свойствах основной и сплайс-изоформ в исследованных клеточных моделях.

**ИММУНОГЕННЫЕ ПУТИ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК,
ИНДУЦИРУЕМЫЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ
С ПРИМЕНЕНИЕМ НОВЫХ ФОТОАГЕНТОВ
НА ОСНОВЕ ПОРФИРАЗИНОВ ***

**IMMUNOGENIC PATHWAYS OF CONTROLLED CELL DEATH
BY PHOTODYNAMIC THERAPY USING NEW PHOTOAGENTS
BASED ON PORPHYRAZINS**

В. Д. Турубанова^{1,2}, Ю. В. Ефимова^{2,3}, И. В. Балалаева¹, Т. А. Мищенко¹,
М. О. Савюк¹, М. В. Ведунова¹, Д. В. Крысько^{1,2,3}

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н. И. Лобачевского

²Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT), кафедра
анатомии и регенерации человека, Гентский университет, Гент, Бельгия

³Институт исследований рака, Гент, Бельгия

V. D. Turubanova^{1,2}, Yu. V. Efimova^{1,3}, I. V. Balalaeva¹, T. A. Mishchenko¹,
M. O. Savuk¹, M. V. Vedunova¹, D. V. Krysko^{1,2,3}

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

²Cell Death Investigation and Therapy (CDIT) Laboratory, Department of Human
Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium

³Cancer Research Institute Ghent, Ghent, Belgium

E-mail: vikaturu@mail.ru

Аннотация

Иммуногенность умирающих раковых клеток определяет эффективность противораковой терапии. Фотодинамическая терапия (ФДТ) может вызывать иммуногенную клеточную смерть (ICD), которая характеризуется испусканием молекулярных паттернов, связанных с повреждениями (DAMP), от умирающих клеток. Целью этой работы было проанализировать, могут ли фотосенсибилизаторы на основе порфиразинов (pz I или pz III), индуцировать ICD in vitro и in vivo при использовании

© В. Д. Турубанова, Ю. В. Ефимова, И. В. Балалаева, Т. А. Мищенко, М. О. Савюк, М. В. Ведунова, Д. В. Крысько, 2020

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00279).

в ФДТ. Определены оптимальные условия индукции клеточной смерти, охарактеризована локализация порфиразинов в клеточных компартментах. Ингибиторным анализом определен тип клеточной смерти. Показано, что раковые клетки, индуцированные ФДТ, высвобождали HMGB1 и АТФ и были поглощены дендритными клетками *in vitro*. Мы демонстрируем, что раковые клетки после индукции гибели клеток с помощью рз I-ФДТ или рз III-ФДТ являются протекторами при использовании в модели профилактической вакцинации против опухолей на мышах.

Abstract

The immunogenicity of dying cancer cells determines the effectiveness of cancer therapy. Photodynamic therapy (PDT) can induce immunogenic form of cell death (ICD), which is characterized by the release of damage-associated molecular patterns (DAMP) from dying cells. The aim of this work was to analyze porphyrazine-based PDT and to characterize their immunogenicity. The optimal conditions for the induction of cell death have been determined, and the localization of porphyrazines in cell compartments has been characterized. Inhibitory analysis determined the type of cell death. It was shown that cancer cells induced by PDT released HMGB1 and ATP and were engulfed up by dendritic cells *in vitro*. We demonstrate that cancer cells, after induction of cell death by рз I-PDT or рз III-PDT, are effectively protect mice in a tumor prophylactic vaccination model.

В настоящий момент существующие терапии рака не гарантируют выздоровления и не обеспечивают защиту от рецидивов, при этом имея большое количество побочных эффектов. Концепция иммуногенной клеточной смерти раковых клеток состоит в том, что умирающие опухолевые клетки испускают DAMPs, которые узнаются антигенпрезентирующими клетками иммунной системы. После антигены опухоли могут быть представлены Т-клеткам, таким образом активируя реакции адаптивного иммунного ответа [1]. Показана высокая эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) при лечении опухолей разных типов [2]. Известно, что только несколько фотосенсибилизаторов вызывают ICD и поэтому существует потребность в разработке новых фотосенсибилизаторов, которые могут вызывать ICD.

Цель данной работы — проанализировать, способны ли новые фотосенсибилизаторы тетра(арил)терацианпорфиразины индуцировать все характеристики иммуногенной клеточной смерти.

Мы определили оптимальные концентрации фотосенсибилизаторов и обнаружили, что при дозе 20 Дж / см² (λех 615–635 нм) как рз I, так и рз III эффективно индуцируют гибель раковых клеток. Мы демонстрируем, что эти фотосенсибилизаторы локализованы преимущественно в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулууме. Гибель клеток, вызванная

рз I-ФДТ, ингибировалась zVAD-fmk (ингибитор апоптоза), а рз III-ФДТ, ингибировалась z-VAD-fmk и ингибитором некроптоза, некростатином-1 s. Раковые клетки, индуцированные рз I-ФДТ или рз III-ФДТ, высвобождали НМGB1 и АТФ и были поглощены дендритными клетками костного мозга *in vitro*. Мы демонстрируем, что раковые клетки после индукции гибели клеток с помощью рз I-ФДТ или рз III-ФДТ являются протекторами при использовании в модели профилактической вакцинации против опухолей на мышах. В совокупности мы показали, что два новых порфирина являются мощными индукторами ICD, которые можно эффективно применять при ФДТ для противораковой терапии.

Литература

1. Galluzzi L. et al. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy // *Science Translational Medicine*. 2019. V. 10. Iss. 459.
2. Garg A. D., Krysko D. V., Vandenabeele P., Agostinis P. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin // *Cancer Immunol Immunother*. 2012. V. 61. P.215–21.

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
ДЛЯ МУЛТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ФАКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА БЕЗ ЕЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО
ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ЕГО ВЕРЕФИКАЦИЕЙ**

**APPLICATION OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY
FOR MULTIPLEX ANALYSIS OF INFLAMMATION FACTORS WITHOUT
ITS PRELIMINARY FRACTIONATION**

А. А. Тюлин¹, А. С. Тараскин^{1,2}, А. В. Протасов^{1,2}, О. А. Миргородская²

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
² НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург

A. A. Tyulin¹, A. S. Taraskin^{1,2}, A. V. Protasov^{1,2}, O. A. Mirgorodskaya²

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
² Smorodintsev Research Institute of Influenza,
Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg

E-mail: tyulin.aa@edu.spbstu.ru

Аннотация

На настоящий момент известно множество биомаркеров, которые могут представлять интерес при диагностике сепсиса и системного воспаления, однако они недостаточно надежны для использования в качестве единого критерия молекулярной диагностики. Поэтому основной задачей данного исследования являлась верификация метода MALDI-TOF MS, с применением изотопно-меченных внутренних стандартов, обладающего потенциальной возможностью выступать в качестве тест-системы, позволяющей одновременно и достаточно быстро количественно оценивать уровень биомаркеров воспаления в цельной сыворотке крови без ее предварительного фракционирования. Данный подход в перспективе может быть использован для дифференциального мониторинга патологии, а также контроля за тяжестью течения заболевания пациента. На выборке из 87 пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, вирусом гриппа А, коронавирусной инфекцией и контрольной группы здоровых доноров был определен уровень таких биомаркеров, как альфа-2-макроглобулин, альфа-2-HS-гликопротеин (фетуин А), сывороточный амилоид А с помощью предложенного масс-спектрометрического подхода и коммерческих наборов для иммуоферментного анализа. Заявлена

возможность измерения фибринопептида А как еще одного маркера воспаления с помощью разработанной методики. После анализа полученных данных была установлена линейная корреляционная зависимость измеряемых концентраций между двумя разными методами.

Abstract

Currently, numerous biomarkers are known to be of interest in the diagnosis of sepsis and systemic inflammation response syndrome (SIRS). However, none of the proposed protein factors features the necessary reliability for use as a single, molecular diagnostic criterion. Therefore, the aim of this work was to validate a MALDI-TOF MS method allowing quick and simultaneous detection of biomarkers in biological fluids (blood serum) without fractionation. The method may permit differential pathology monitoring or severity forecasting. For 87 serum specimens, MALDI-TOF MS and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to determine the levels of the following inflammatory markers: alpha-2-macroglobulin (α 2-MG); alpha-2-HS-glycoprotein (fetuin A); and serum amyloid A (SAA). The feasibility of fibrinopeptide A detection is also presented. After analyzing concentrations measured by the two different methods, linear concentration correlations were established.

Целью данного исследования являлась верификация метода MALDI-TOF масс-спектрометрии, который позволяет количественно определять ряд воспалительных маркеров: альфа-2-макроглобулин, альфа-2-HS-гликопротеин (фетуин А), сывороточный амилоид А и фибринопептид А в сыворотках крови человека с применением изотопно-меченного внутреннего стандарта (пептида, содержащего стабильные изотопы кислорода ^{18}O) в цельной сыворотке крови без ее предварительного фракционирования.

На выборке из 87 пациентов, включающих в себя больных коронавирусной инфекцией, сепсисом, гриппом и контрольную группу здоровых доноров, количественно оценивали уровень следующих маркеров воспаления: альфа-2-макроглобулин, альфа-2-HS-гликопротеин (фетуин А) и сывороточный амилоид А. Уровни вышеперечисленных маркеров были измерены при помощи разрабатываемого масс-спектрометрического подхода, предполагающего мультиплексность измерения маркеров. Полученные данные были верифицированы с помощью коммерческого набора для иммуноферментного анализа (ИФА). В группе больных с наличием коронавирусной инфекции, гриппа и сепсиса было отмечено отклонение от референсных значений таких маркеров воспаления, как альфа-2-HS-гликопротеин (фетуин А) и сывороточный амилоид А. В результате сопоставления результатов двух методов была выявлена положительная линейная корреляция метода ИФА и масс-спектрометрического подхода. В работе была исследована возмож-

ность измерения фибринопептида А как еще одного маркера воспаления с помощью разработанной методики. Предлагаемый метод выступает еще одним шагом в направлении к пациент-ориентированной диагностике и лечению, в том числе основанному на использовании рациональных принципов антибиотикотерапии.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ
МОДЕЛЬНОГО РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ
MACROSTOMUM LIGNANO *

DEVELOPING AN EXPERIMENTAL PLATFORM TO STUDY
MECHANISMS OF STEM CELL DIFFERENTIATION USING
A MODEL REGENERATIVE FLATWORM *MACROSTOMUM LIGNANO*

К. В. Устьянцев¹, В. Ю. Вавилова¹, М. Ю. Бирюков¹,
Ф. Рейноите², Я. Вударски², С. Мутон², Е. В. Березиков¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Европейский институт проблем биологии старения (ERIBA),
Гронинген, Нидерланды

K. V. Ustyantsev¹, V. Yu. Vavilova¹, M. Yu. Biryukov¹,
F. Reinoite², J. Wudarski², S. Mouton², E. V. Berezikov¹

¹Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

²European Research Institute for the Biology of Ageing (ERIBA),
UMCG, Groningen, Netherlands

E-mail: eberez@bionet.nsc.ru

Abstract

Regeneration depends on the cell renewal by proliferation and differentiation of stem cells (SCs). Partially due to the lack of suitable model organisms, we are only starting to grasp how SCs differentiate into various cell types during regeneration.

We are developing the free-living flatworm *Macrostomum lignano* as a model to address many of the questions in the field of regeneration research due to its unique features, such as production of single cell eggs, a transparent body, and whole-body regeneration enabled by the SCs called neoblasts (NBs). We have developed a large experimental toolbox for this animal, including stable transgenesis

© К. В. Устьянцев, В. Ю. Вавилова, М. Ю. Бирюков, Ф. Рейноите, Я. Вударски, С. Мутон, Е. В. Березиков, 2020

* The work was supported by the Russian Science Foundation grant № 20-14-00147.

and gene knock-in using CRISPR/Cas9, which is unique among flatworms. To study the molecular programs of SCs differentiation during regeneration, we have created a double-reporter transgenic *M. lignano* line where NBs and muscle cells are labeled with green (mNeonGreen) and red (mScarlet) fluorescent proteins, respectively. The line allows isolation of NBs, differentiated muscle cells, and NBs differentiating into muscle cells, by FACS. The study of transcriptional states of the isolated NBs, progenitors, and differentiated cells using single cell and bulk RNA sequencing of cell populations will reveal the candidate genes driving differentiation into muscles. Successful validation of the platform will allow deciphering the underlying mechanisms of SCs differentiation during regeneration in the other cell types.

**УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ AF
В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ**

**THE LEVEL OF DNA DAMAGE IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
OF THE AF LINE IN THE LONG-TERM PERIOD AFTER IRRADIATION**

К. М. Фабушева, Ю. В. Дворник

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

K. M. Fabusheva, Y. V. Dvornik

Institute of Radiobiology of NAS of Belarus, Gomel, Belarus

E-mail: expmodels@irb.basnet.by

Аннотация

В отдаленный период после однократного облучения в дозе 3Гр у мышей линии Af наблюдается повышенный уровень повреждения ДНК в лимфоцитах периферической крови, что может быть обусловлено преждевременным радиационно-индуцированным старением и развитием неопластических процессов в организме животного.

Abstract

In the long term, after a single irradiation et a dose of 3 Gy, Af mice exhibit an increased level of DNA damage in peripheral blood lymphocytes, which may be due to premature radiation-induced aging and the development of neoplastic processes in the animal's body.

Введение

Первичный эффект ионизирующего излучения заключается в образовании однонитевых или двунитевых разрывов в молекуле ДНК, приводящих к хромосомным абберациям. Повреждение ядра приводит к синтезу измененных белков, которые впоследствии способствуют образованию злокачественных опухолей, вторичных радиотоксинов, вызывающих лучевую болезнь и преждевременное старение. Метод ДНК-комет используется для исследования влияния генотоксических факторов окружающей среды в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Цель — оценить уровень повреждения ДНК в лимфоцитах периферической крови мышей линии Af в отдаленный период после облучения.

Материалы и методы

В эксперименте использовали мышей самцов линии Af, 2,5–3-месячного возраста. Экспериментальная группа животных подверглась общему однократному равномерному облучению при помощи рентгеновской установки X-Rad 320 (Precision X-ray Inc.) в дозе 3 Гр, мощность дозы 155сГр/мин.

Через 6 месяцев после облучения животные были выведены из эксперимента, был проведен анализ поврежденности ДНК на лимфоцитах, выделенных из гепаринизированной крови путем центрифугирования на градиенте плотности (Histopaque, Sigma). Уровень ДНК повреждений определяли методом щелочного гель-электрофореза (метод ДНК-комет). Полученные изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CometScore. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет.

Результаты

Исследование уровня повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови мышей линии Af в норме и после воздействия ионизирующего излучения при помощи метода ДНК-комет показало, что процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет в контрольной группе составило $6,90 \pm 0,82$ %. В опытной группе данный показатель увеличился в 1,89 раз и составил $13,08 \pm 1,95$ % ($p < 0,05$).

Помимо этого, в группе облученных животных в 1,38 раза возросло количество поврежденных лимфоцитов периферической крови по сравнению с группой «Контроль», общая частота поврежденных ядер составила $25,08 \pm 3,10$ % в опыте и $18,17 \pm 2,32$ % в контроле.

Заключение

Инбредные мыши линии Af склонны к спонтанному образованию опухолей, преимущественно в легочной ткани и теле, уровень которого значительно возрастает при старении животных. В отдаленный период после однократного облучения в дозе 3Гр у мышей линии Af наблюдается повышенный уровень повреждения ДНК в лимфоцитах периферической крови, что может быть обусловлено преждевременным радиационно-индуцированным старением и развитием неопластических процессов в организме животного.

**ФОТОАКТИВИРУЕМАЯ СИСТЕМА CRISPR/
CAS9 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЛОКИРУЮЩИХ
ФОТОРАСЩЕПЛЯЕМЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ***

**PHOTOACTIVATABLE SYSTEM CRISPR/CAS9 USING BLOCKING
PHOTOCLEAVABLE OLIGONUCLEOTIDES**

Е. А. Хабардина^{1,2}, О. А. Семиколенова^{1,2},
Н. А. Данилин^{1,2}, К. И. Махалова^{1,2,3}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*
³ *Новосибирский государственный университет*

E. A. Khabardina^{1,2}, O. A. Semikolenova^{1,2},
N. A. Danilin^{1,2}, K. I. Makhalova^{1,2,3}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
² *Sirius University of Science and Technology, Sochi*
³ *Novosibirsk State University*

E-mail: o.semikolenova@g.nsu.ru

Аннотация

Разработан подход к созданию фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9, содержащей белок Cas9 и химерную 102-звенную направляющую sgРНК или пару направляющих crРНК/tracrРНК и блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды. Блокирующие олигодезоксирибонуклеотиды содержали фоторасщепляемые линкеры на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола в своем составе. Продемонстрирована возможность фотоактивации геномного редактирования с использованием фоторасщепляемых блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов.

Abstract

The approach to the design of photoactivatable system CRISPR/Cas9 included Cas9 protein and chimeric 102-nt guide sgRNA or pair of guide crRNA/tracrRNA and blocking photocleavable oligodeoxyribonucleotides was developed. Blocking oligodeoxy-

© Е. А. Хабардина, О. А. Семиколенова, Н. А. Данилин, К. И. Махалова, 2020

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научно-го проекта № 19-34-51026 (Научное наставничество, рук. Д. С. Новопашина).

ribonucleotides contained photocleavable linkers on the base of 1-(2-nitrophenyl)-1,2-ethanediol in their structure. The possibility of photoactivatable gene editing using photocleavable blocking oligodeoxyribonucleotides was demonstrated.

Регуляция путем облучения светом определенной длины волны позволяет эффективно управлять активностью различных молекулярно-биологических систем *in vitro* и *in vivo*. Введение фоточувствительных компонентов в состав олигонуклеотидов или белков позволяет изменять их активность с высоким пространственно-временным разрешением в клетках. В зависимости от дизайна таких биомолекул возникает возможность их активировать, например, за счет удаления фотоблокирующей группы под действием света, изменять их вторичную структуру за счет изменения конформации введенного фоточувствительного линкера или расщеплять их на части за счет гидролиза фоточувствительного линкера.

CRISPR/Cas9 система является перспективным инструментом редактирования генома. Комплекс направляющих РНК (sgРНК или crРНК/tracrРНК) и Cas9 белка позволяет с высокой эффективностью вносить разрывы в заданные положения ДНК. Перспективным является создание фотоактивируемых CRISPR/Cas9 систем с целью контроля за их активностью с помощью облучения.

Целью работы являлась разработка фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9, содержащей белок Cas9, химерную 102-звенную sgРНК или пару направляющих crРНК/tracrРНК и блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды.

Для создания фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9 нами были получены фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные фрагменту направляющей РНК в области связывания с ДНК-мишенью. Фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды длиной 20 или 30 нуклеотидов содержали два или три фоторасщепляемых линкера на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола в своем составе, позволяющих гидролизовать блокирующие олигонуклеотиды в течение 5 минут путем облучения светом на длине волны 365 нм и запустить систему редактирования генома. По данным термической денатурации и метода задержки в геле стабильность комплексов таких модифицированных олигонуклеотидов с направляющей РНК уменьшалась с увеличением количества линкеров.

Продемонстрирована возможность блокирования функций направляющей РНК с использованием немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов и возможность фотоактивации геномного редактирования с использованием фоторасщепляемых блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов.

ИНГИБИРОВАНИЕ ТИРОЗИЛ-ДНК ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПИРИМИДИНОВЫМИ НУКЛЕОЗИДАМИ *

INHIBITION OF TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1 BY LIPOPHILIC PYRIMIDINE NUCLEOSIDES

И. А. Чернышова¹, А. Л. Захаренко²,
М. Дреничев³, С. Н. Михайлов³, О. И. Лаврик^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет

² Институт химической биологии

и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

I. A. Chernyshova¹, A. L. Zakharenko²,
M. Drenichev³, S. N. Mikhailov³, O. I. Lavrik^{1,2}

¹ Novosibirsk State University

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

E-mail: chernyshova0305@gmail.com

Аннотация

Исследовано ингибирование ферментов репарации ДНК тирозил-ДНК фосфодиэстеразы 1 и поли(АДФ-рибоза)полимераз 1 и 2 липофильными производными пиримидиновых нуклеозидов. Новые эффективные ингибиторы Tdp1 были обнаружены в серии нуклеозидных производных, обладающих 2', 3', 5'-три-О-бензоил-Д-рибофуранозой и 5-замещенными урациловыми фрагментами. Среди изученных соединений ингибиторов PARP1/2 обнаружено не было (остаточная активность в присутствии веществ 1 мМ составляла 50–100 %).

Abstract

The effect of lipophilic nucleoside derivatives on the DNA repair enzymes tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 and poly (ADP-ribose)polymerases 1 and 2 was studied. Tdp1 inhibitors with half-maximal inhibitory concentrations (IC50) in the lower micromolar and submicromolar range were found in a series of derivatives with 2', 3', 5'- tri-O-benzo-

yl-D-ribofuranose and 5-substituted uracil fragments. There are no PARP 1/2 inhibitors among the studied compounds (residual activity in the presence of 1 mM substances was 50–100 %).

Фермент тирозил-ДНК фосфодиэстераза 1 (Tdp1) считается важной мишенью для противоопухолевой терапии на основе ингибиторов топоизомеразы 1 (Top1) [1]. Tdp1 играет ключевую роль в удалении аддуктов Top1-ДНК, стабилизированных ингибиторами Top1, такими как камптотецин и его клинически значимые производные. В литературе описаны ингибиторы Tdp1 различных структур на основе различных классов природных и синтетических соединений [2, 3], имеющие полумаксимальные ингибирующие концентрации (IC₅₀) в диапазоне 0,015–10,000 мкМ. Недавно среди дисахаридных нуклеозидов с липофильными группами была обнаружена новая группа ингибиторов Tdp1, эффективных в субмикромольном диапазоне концентраций [4]. Поэтому в качестве потенциальных ингибиторов была выбрана серия липофильных нуклеозидных производных, обладающих 2', 3', 5'-три-О-бензоил-D-рибофуранозой и 5-замещенными урациловыми фрагментами.

Скрининг соединений проводился флуоресцентным методом, основанном на измерении интенсивности флуоресценции в реакции удаления гасителя из флуорофора гаситель-ДНК олигонуклеотид, катализируемой Tdp1 в присутствии ингибитора.

Выявлен ряд соединений, обладающих выраженным ингибирующим действием, выявлена зависимость ингибиторной активности от структуры соединений.

Показано, что липофильные пиримидиновые нуклеозиды имеют IC₅₀ в нижнем микромолярном и субмикромольном диапазоне и обладают низкой цитотоксичностью. Таким образом, эти соединения могут считаться перспективными для дальнейшей разработки и оптимизации структуры соединений, сенсibiliзирующих раковые клетки к топотекану.

Литература

1. Comeaux E. Q., Waardenburg R. C. A. M. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // *Drug Metabolism Reviews*. 2014. Vol. 46. № 4. P. 494–507.
2. Brettrager E. J., Waardenburg R. C. A. M. Targeting Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I to enhance toxicity of phosphodiester linked DNA-adducts// *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*. 2019. Vol. 2. P.1153–1163.

3. Zakharenko A. et al. Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity // Medicinal Research Reviews. 2019. Vol. 39. № 4. P. 1427–1441.

4. Komarova A. O. et al. Novel group of tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 inhibitors based on disaccharide nucleosides as drug prototypes for anti-cancer therapy // Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 2018. Vol. 33. №. 1. P. 1415–1429.

**КРАБОПОДОБНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ПЕПТИДНЫЕ
КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ИНГИБИРОВАНИЯ
ОНКОГЕННЫХ МИКРОРНК***

**CRAB OLIGONUCLEOTIDE-PEPTIDE CONJUGATES FOR TARGETED
INHIBITION OF ONCOGENIC MICRORNAS**

Д. А. Чиглинцева^{1,2}, О. А. Патутина¹, Т. Хейман³, Е. В. Биченкова³,
С. К. Гапонова¹, В. В. Власов¹, М. А. Зенкова¹

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Университет Манчестера, Великобритания*

D. A. Chiglintseva^{1,2}, O. A. Patutina¹, T. Heyman³, E. V. Bichenkova³,
S. K. Gaponova¹, V. V. Vlassov¹, M. A. Zenkova¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

² *Novosibirsk State University*

³ *University of Manchester*

E-mail: dashachiglintseva@gmail.com

Аннотация

Разработаны и исследованы новые миРНК-направленные сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы крабоподобной структуры, которые способны осуществлять эффективное расщепление онкогенной миРНК-мишени в функционально значимых областях молекулы — в «5'-затравочной» и «3'-компенсаторной» областях миРНК.

Abstract

We designed and investigated the novel type of miRNA-targeted sequence-specific artificial ribonucleases with Crab-like structure, which effectively cleave oncogenic microRNA target at functionally significant "5'-seed" and "3'-compensatory" regions of miRNA.

© Д. А. Чиглинцева, О. А. Патутина, Т. Хейман, Е. В. Биченкова, С. К. Гапонова, В. В. Власов, М. А. Зенкова, 2020

* Работа поддержана грантом РФФ 19-14-00250 и проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.

Нарушение экспрессии микроРНК (миРНК) наблюдается при множестве патологических состояний, в том числе при онкологических заболеваниях. Перспективной стратегией для инактивации избыточного количества онкогенных миРНК является применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз (иРНКаз). Ранее нашей научной группой были разработаны миРНК-адресованные иРНКазы различной структуры, которые осуществляли расщепление миРНК в 3'-области [1, 2] и в ее центральной части [3], вызывая ее эффективное подавление в опухолевых клетках.

В данной работе разработаны и исследованы сиквенс-специфические иРНКазы нового дизайна — крабоподобные иРНКазы, состоящие из олигонуклеотида, комплементарного центральной части онкогенной миРНК-21, и двух расщепляющих пептидов [(LeuArg)₂Gly]₂, присоединенных по 5'- и 3'-концам адресующей последовательности. Уникальность разработанных нуклеаз заключается в способности конъюгатов осуществлять расщепление миРНК в «5'-затравочной» и «3'-компенсаторной» областях молекулы, имеющих решающее значение для специфичности и функционирования миРНК. Показано, что к 48 ч разработанные конъюгаты способны вызывать полную деградацию миРНК-мишени. Исключительной характеристикой разработанных нуклеаз является способность расщеплять миРНК в каталитическом режиме, что подразумевает деградацию множества копий миРНК. Доказано синергическое действие конъюгата и РНКазы Н: в присутствии РНКазы Н число оборотов реакции увеличивается в 25 раз, что, несомненно, будет способствовать эффективной деградации миРНК в клетках.

Литература

1. Patutina O. A. et al. MiRNases: novel peptide-oligonucleotide bioconjugates that silence miR-21 in lymphosarcoma cells // *Biomaterials*. 2017. Vol. 122. P. 163–178.
2. Patutina O. A. et al. Catalytic knockdown of miR-21 by artificial ribonuclease: biological performance in tumor model // *Front. Pharmacol*. 2019. Vol. 10. P. 879.
3. Patutina O. A. et al. Dual miRNases for Triple Incision of miRNA Target: Design Concept and Catalytic Performance // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 2459.

РИСК СОМАТИЧЕСКИХ ДЕЛЕЦИЙ МИТОХОНДРИЙ ЗАВИСИТ ОТ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ***RISK OF SOMATIC MITOCHONDRIAL DELETIONS IS AFFECTED BY THE SECONDARY STRUCTURE OF THE MITOCHONDRIAL GENOME**

[#]В. А. Шаманский¹, [#]А. А. Михайлова¹, [#]К. Ушакова¹, [#]А. Г. Михайлова^{1,2},
С. Орешков¹, Д. Кнорре^{3,4}, Е. О. Третьяков⁵, М. Зажицкая⁶, С. В. Луковски⁷,
Чиа-Вэй Лиу⁸, Цу-Кунг Линь⁸, В. С. Кунц^{9,10}, А. Реймонд¹¹,
И. Мазунин¹², Г. А. Базыкин^{12,13}, К. Гунбин^{1,14}, Ж. Фелле¹⁵,
М. Танака¹⁶⁻¹⁸, К. Храпко¹⁹, К. Попадьян^{1,11,15}

¹ Балтийский федеральный университет
им. Иммануила Канта, Калининград

² Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова, Москва

³ НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва

⁴ Institute of Molecular Medicine, Sechenov University, Moscow

⁵ Венский медицинский университет, Austria

⁶ Колумбийский университет, Нью-Йорк, США

⁷ Институт молекулярной биологии,
Квинслендский университет, Брисбен, Австралия

⁸ Мемориальный госпиталь Гаосюн Чангун и университет Чангун, Тайвань

⁹ Боннский университет, Бонн, Германия

¹⁰ Университетская клиника Бонна, Бонн, Германия

¹¹ Центр интегративной геномики, Лозанна, Швейцария

¹² Сколтех, Сколково

¹³ Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича, Москва

¹⁴ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

¹⁵ Федеральная политехническая школа Лозанны, Швейцария

¹⁶ Национальный институт биомедицинских инноваций,
здоровья и питания, Токио, Япония

© В. А. Шаманский, А. А. Михайлова, К. Ушакова, А. Г. Михайлова, С. Орешков, Д. Кнорре, Е. О. Третьяков, М. Зажицкая, С. В. Луковски, Чиа-Вэй Лиу, Цу-Кунг Линь, В. С. Кунц, А. Реймонд, И. Мазунин, Г. А. Базыкин, К. Гунбин, Ж. Фелле, М. Танака, К. Храпко, К. Попадьян, 2020

* This work is supported by the 5 Top 100 Russian Academic Excellence Project at the Immanuel Kant Baltic Federal University, and by the Russian Foundation for Basic Research grant 18-29-13055.

[#] These authors contributed equally to this work.

¹⁷ *Университет Juntendo, Токио, Япония*

¹⁸ *Итабаси Медикал Систем Больница общего профиля Миёси, Миёси-мати, Япония*

Saitama Prefecture, 354-0041 Japan

¹⁹ *Северо-Восточный университет, Бостон, США*

#V. A. Shamanskiy ¹, #A. A. Mikhailova ¹, #K. Ushakova ¹, #A. G. Mikhailova ^{1,2},
S. Oreshkov ¹, D. Knorre ^{3,4}, E. O. Tretiakov ⁵, M. Zazhytska ⁶, S. W. Lukowski ⁷,
Chia-Wei Liou ⁸, Tsu-Kung Lin ⁸, W.S. Kunz ^{9,10}, A. Reymond ¹¹,
I. Mazunin ¹², G. A. Bazykin ^{12,13}, K. Gunbin ^{1,14}, J. Fellay ¹⁵,
M. Tanaka ¹⁶⁻¹⁸, K. Khrapko ¹⁹, K. Popadin ^{1,11,15}

¹ *Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

² *Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia*

³ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Moscow*

⁴ *Institute of Molecular Medicine, Sechenov University, Moscow*

⁵ *MedUni Wien, Vienna, Austria*

⁶ *Zuckerman Institute, Columbia University, New York*

⁷ *Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, St Lucia, Brisbane, Australia*

⁸ *Kaohsiung Chang-Gung Memorial Hospital and Chang-Gung University, Taiwan*

⁹ *University Bonn, Bonn, Germany*

¹⁰ *University Hospital of Bonn, Bonn, Germany*

¹¹ *Center for Integrative Genomics, Lausanne, Switzerland*

¹² *Skoltech, Skolkovo, Russia*

¹³ *Institute for Information Transmission Problems, Moscow*

¹⁴ *Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk*

¹⁵ *EPFL, Lausanne, Switzerland*

¹⁶ *National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Tokyo, Japan*

¹⁷ *Juntendo University, Tokyo, Japan*

¹⁸ *IMS Miyoshi General Hospital, Miyoshi-machi, Japan*

¹⁹ *Northeastern University, Boston, MA, USA*

E-mail: v.a.shamanskiy@gmail.com

Аннотация

Старение связано с накоплением соматических мутаций как в ядерном, так и в митохондриальном (мтДНК) геномах. На риск соматических делеций митохондрий влияет вторичная структура митохондриального генома.

Abstract

Aging is associated with accumulation of somatic mutations in both nuclear and mitochondrial (mtDNA) genomes. Risk of somatic mitochondrial deletions is affected by the secondary structure of the mitochondrial genome.

Ageing is associated with accumulation of somatic mutations. This process is especially pronounced in mitochondrial genomes (mtDNA) of postmitotic cells, where the accumulation of somatic mitochondrial deletions is associated with healthy ageing and mitochondrial encephalomyopathies. Deletions are often flanked by direct nucleotide repeats, however, they do not provide an exhaustive explanation of deletion distribution. We hypothesized that in parallel with the role of direct repeats there is also a global secondary structure of mtDNA, shaping deletion formation. Analyzing the folding energies of the heavy chain, which stays single-stranded during mtDNA replication, we observed a potential contact zone between 6–9 kb and 13–16 kb of the major arc of mtDNA. Describing the distribution of deletions in the human mtDNA we demonstrated that the contact zone is 3-times more mutagenic under all else equal. The proposed topological model improves our understanding of the mechanisms of deletion formation in the human mitochondrial genome.

**ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА VEGF И VEGFR В БИОПТАТАХ
ИНТАКТНОГО МИОМЕТРИЯ ПРИ МИОМЭКТОМИИ
У ЖЕНЩИН РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП**

**EVALUATION OF VEGF AND VEGFR EXPRESSION IN INTACT
MYOMETRIAL BIOPSIES IN DIFFERENT AGE GROUPS WOMEN
DURING MYOMECTOMY**

А. И. Шаповалова

*Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии»*

A. I. Shapovalova

St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology

E-mail: alexandra.sh7@mail.ru

Аннотация

Факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) являются регуляторами репарации тканей и в зависимости от их структуры и рецепторной специфичности могут также способствовать рубцеванию. Повышенный уровень мембранного рецептора VEGFR оказывает позитивное действие на предотвращение избыточного рубцевания.

Abstract

Vascular endothelial growth factors (VEGFs) are tissue repair regulators and depending on their structure and receptor specificity, they can also contribute to scar tissue formation. The increased level of VEGFR has a positive effect on the prevention of excessive scarring.

Актуальность проблемы

На сегодняшний день выбор метода родоразрешения у женщин после миомэктомии является важным для оптимального родоразрешения у женщин с рубцом на матке. Основным хирургическим методом лечения при наличии миомы матки у женщин, планирующих беременность, в настоящее время является консервативная миомэктомия. На качество рубца оказывает влияние репаративная активность миометрия в области удаленных мио-

матозных узлов. Регуляторами репарации тканей являются факторы роста эндотелия сосудов (VEGF), и в зависимости от их структуры и рецепторной специфичности они могут также способствовать рубцеванию. Особенно важно, что повышенный уровень VEGFR оказывает позитивное действие на предотвращение избыточного рубцевания. До сих пор количественные показатели для этого маркера в биоптатах интактного миометрия, ассоциированные с возрастом женщин, не установлены.

Цель исследования — установить зависимость экспрессии маркера VEGF и VEGFR в биоптатах интактного миометрия и возраста женщин.

Материалы и методы исследования

Материал был получен методом трепан-биопсии интактного миометрия в зоне, прилежащей к миоматозному узлу во время лапароскопической консервативной миомэктомии. Операция проводилась на 7–10 день менструального цикла. Первую группу ($n = 10$) составили женщины в возрасте от 23 до 29 лет, вторую ($n = 15$) — от 30 до 47 лет. Иммуногистохимическая реакция была проведена с первичными антителами к маркеру VEGF и VEGFR (1:100; Novocastra). В качестве вторичных антител использовали Alexa 647; ядра докрашивали DAPI. Морфометрический анализ был проведен в программе «Морфология 5.2» (Видиотест, Россия) на конфокальном микроскопе Olympus. Площадь экспрессии, выраженную в процентах, и оптическую плотность оценивали на системе компьютерного анализа микроскопических изображений «Видеотест-Морфология 5.0» с применением статистических методов. Критерий корреляции Спирмана ($r = 0,8$) применялся для оценки взаимосвязи между возрастом пациенток и уровнем относительной площади экспрессии маркера неангиогенеза VEGF и RVEGF.

Результаты исследования

Среднее значение площади экспрессии VEGF и RVEGF в 1-й группе было выше, чем во 2-й, и составило $14,7 \pm 1,49$ (ср. со 2-й: $7,4 \pm 1,62$). Коэффициент Спирмана между возрастом женщин и относительной площадью экспрессии VEGF и RVEGF составил 0,8 ($r = 0,8$), что указывает на наличие связи высокой тесноты.

Выводы

Экспрессия маркера VEGF и VEGFR в биоптатах интактного миометрия с возрастом уменьшается, что свидетельствует о снижении активности процессов репарации, а значит, является неблагоприятным фактором для образования состоятельного рубца на матке у женщин старшего репродуктивного возраста.

ДОСТАВКА МРНК ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА С ПОМОЩЬЮ КАТИОННОГО ПОЛИСАХАРИДНОГО ПОЛИМЕРА

DELIVERY OF mRNA VACCINES AGAINST THE INFLUENZA VIRUS USING A CATIONIC POLYSACCHARIDE POLYMER

С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, Е. А. Волосникова,
Л. И. Карпенко, С. И. Бажан, А. А. Ильичев

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

S. V. Sharabrin, A. P. Rudometov, E. A. Volosnikova,
L. I. Karpenko, S. I. Bazhan, A. A. Plyichev *

*State Research Center of Virology
and Biotechnology "Vector" Rospotrebnadzor, Koltsovo*

E-mail: sharabrin.sv@gmail.com

Аннотация

Важным аспектом разработки мРНК-вакцин является поиск эффективного способа доставки вакцины. Нами был использован катионный полисахаридный полимер, разработанный на базе ГНЦ ВБ «Вектор» для доставки мРНК, полученной матричным синтезом с ДНК-вакцины, кодирующей консервативный фрагмент стебля гемагглютинаина вируса гриппа. Было подобрано оптимальное зарядовое соотношение мРНК : полиглокин, равное 1:3,75 для защиты и доставки мРНК-вакцины.

Abstract

An important aspect of the development of mRNA vaccines is the search for an efficient method of vaccine delivery. We used a cationic polysaccharide polymer developed on the basis of SRC VB "Vector" for delivery of mRNA obtained by matrix synthesis from a DNA vaccine encoding a conservative fragment of the hemagglutinin stem of the influenza virus. The optimal charge ratio of mRNA: polyglucin was selected, equal to 1: 3.75, for the protection and delivery of the mRNA vaccine.

мРНК вакцины являются одной из новых, перспективных и активно развивающихся вакцинных платформ. Важным аспектом разработки мРНК-вакцин является поиск эффективного способа доставки вакцины в клетку. Серьезной преградой для внутриклеточной доставки мРНК вакцины является клеточная мембрана и деградация РНК различными рибонуклеазами.

Одним из перспективных способов доставки мРНК являются катионные полимеры. Комплексообразование отрицательно заряженной мРНК с катионными полимерами происходит самопроизвольно в результате взаимодействия «заряд — заряд», образуя наноструктуры, которые способны улучшать поглощение мРНК посредством эндоцитоза и защищать мРНК от деградации нуклеазы.

В данной работе в качестве модели вакцины мы использовали мРНК, полученную матричным синтезом с ДНК-вакцины, кодирующей консервативный фрагмент стебля гемагглютинаина вируса гриппа^{*}.

Целью данной работы являлась разработка метода доставки мРНК-вакцины против вируса гриппа с помощью катионного полисахаридного полимера.

Катионный полимер представляет собой конъюгат полиглюкин:спермидин (PG), хорошо зарекомендовавший себя в том числе при разработке вакцины против ВИЧ CombiHIVvac. Молекулярный вес конъюгата — 42000, на одну молекулу полиглюкина приходится 15 молекул спермидина (т. е. 45 катионов). Основными достоинствами конъюгата являются биосовместимость, биоразлагаемость, возможность упаковки молекул нуклеиновых кислот. Положительно заряженный спермидин обеспечивает связывание конъюгата с мРНК.

Нами были рассчитаны концентрации полиглюкина на следующие рядовые соотношения РНК:PG — 1:2, 1:2,5, 1:3,75 и 1:5, что соответствует соотношению по массе 1:8, 1:10, 1:15 и 1:20. PG и РНК были смешаны в выбранных соотношениях, кратко вортиксованы и инкубированы при комнатной температуре в течение часа. Критерием оптимального покрытия мРНК полиглюкином служило замедление движения мРНК в электрическом поле в ходе электрофореза в агарозном геле, степень которого зависит от степени покрытия. Соотношение 1:3,75 оказалось наиболее оптимальным. В этом случае мы наблюдали максимальную разницу в подвижности исходной РНК и РНК, покрытой PG в ходе электрофореза.

^{*} Bazhan S. et al. Immunogenicity and Protective Efficacy of Influenza A DNA Vaccines Encoding Artificial Antigens Based on Conservative Hemagglutinin Stem Region and M2 Protein in Mice // *Vaccines*. 2020. Vol. 8. P. 448.

Таким образом, в результате проведенного исследования было подобрано оптимальное зарядовое соотношение мРНК:полиглокин, равное 1:3,75 для защиты и доставки мРНК-вакцины. Полученные комплексы мРНК:полиглокин были использованы для иммунизации лабораторных животных.

**ДВУЦЕПОЧЕЧНАЯ ДНК С 5'-ДМТ ЗАЩИТНЫМИ ГРУППАМИ:
ПОЛУЧЕНИЕ И УЧАСТИЕ В ЛИГАЗНОЙ РЕАКЦИИ****5'-DMT-PROTECTED DSDNA: SYNTHESIS AND COMPETENCE
TO BLUNT-ENDED LIGATION BY T4 DNA LIGASE**

В. В. Щур, Ю. П. Буренкова, А. И. Жолнерович, С. А. Усанов, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии НАН, Минск, Республика Беларусь

V. Shchur, Y.P. Burenkova, A. I. Zhauniarovich, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich

Institute of Bioorganic Chemistry NAS, Minsk, Belarus

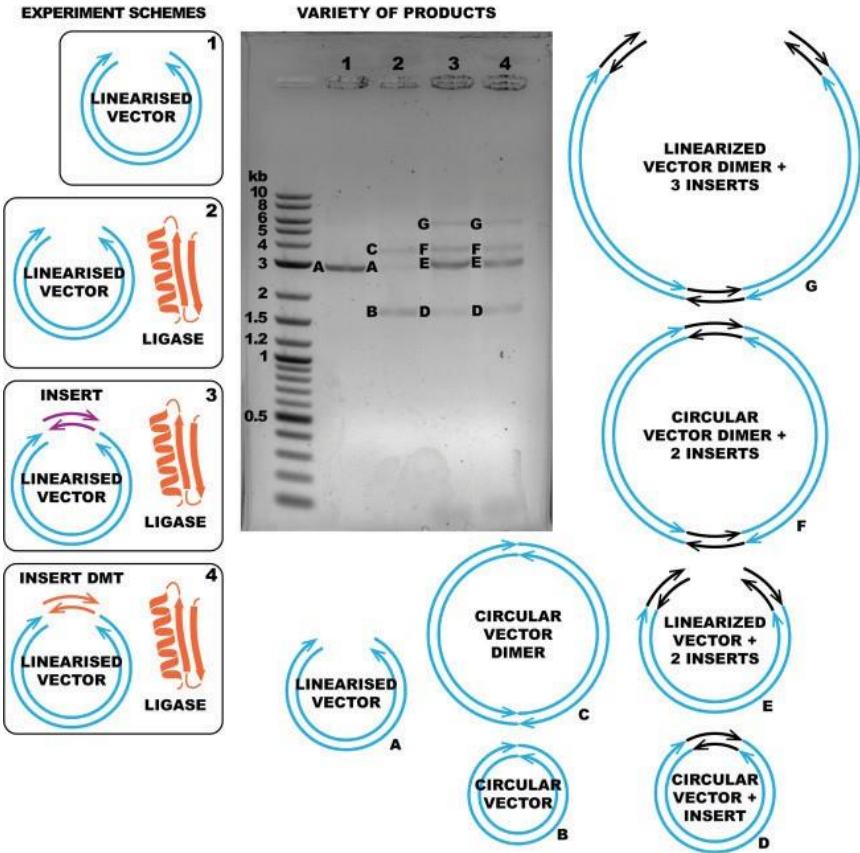
E-mail: shchur931@gmail.com

Аннотация

Согласно нашей гипотезе, для осуществления селективного по сравнению с укороченными побочными продуктами лигирования полнодлинной дцДНК в плазмидный вектор по тупым концам следует осуществить полимеразную цепную сборку (ПЦС) дцДНК с использованием олигонуклеотидов, модифицированных по 5'-ОН концам диметокситритильной (ДМТ) группой, за исключением фланкирующих последовательность праймеров. Мы установили, что 5'-ДМТ-олигонуклеотиды могут быть успешно использованы для получения синтетической 5'-ДМТ дцДНК с помощью ПЦС. Установлен факт, противоречащий нашей гипотезе: возможно осуществить эффективное лигирование 5'-ДМТ дцДНК в плазмидный вектор по тупым концам с помощью Т4 ДНК лигазы. Требуется дальнейшие исследования для изучения возможностей применения 5'-ДМТ дцДНК.

Abstract

According to our hypothesis 5'-OH functionalization by 4,4'-dimethoxytrityl protecting group (DMT) of all oligonucleotides except flanking ones used for polymerase chain assembly (PCA) of synthetic dsDNA would allow to perform selective blunt-end ligation of full-length dsDNA into plasmid vector as compared to shortened by-products. We discovered that 5'-DMT-oligonucleotides can be successfully used during PCA of synthetic 5'-dsDNA. Despite our hypothesis, 5'-DMT dsDNA can be effectively ligated into blunt-end linearized plasmid vector by T4 DNA ligase. Further work on the investigation of application of 5'-DMT dsDNA is required.



The functionalization of 5'-OH group in nucleic acids is of significant value for molecular biology [1]. We assumed that 5'-OH modification could also find application in dsDNA synthesis workflow.

A large number of a shortened by-products are formed during polymerase chain assembly (PCA) of synthetic dsDNA from oligonucleotides. Shortened by-products are more efficiently ligated to the blunt-ended vector as compared to target dsDNA. We suppose that 5'-OH functionalization by 4,4'-dimethoxytrityl (DMT) protective group of all oligonucleotides except flanking ones will allow to get predominantly a vector with a full length insert because DNA ligase will not join bulky hydrophobic 5'-DMT ends of shortened inserts with vector ends.

We use 2 model dsDNAs to test our hypothesis: short 65 bp sequence formed by annealing of two 5'-DMT oligonucleotides, 312 bp sequence synthesized by PCA according to [2].

Earlier we observed stability of DMT-dT₁₅ oligonucleotides in PCR conditions (heating at 98 °C for 15 min in DNA polymerase's buffers with HPLC-UV-MS detection) [3]. In the current study, we demonstrated that DMT-oligonucleotides could be efficiently used for gene assembly as well as PCR amplification. We showed that presence of DMT has only slight effect on DNA electrophoretic mobility in agarose gel.

Despite our assumptions, we found that the presence of 5'-DMT protection does not influence T4 DNA ligase activity in blunt-ended reaction (results for 65 bp fragment — on figure). Moreover, ligation products derived from 5'-DMT dsDNA unexpectedly demonstrated higher transformation efficiency as compared to 5'-OH PCR product ligation.

Further work on the investigation of biological properties of 5'-DMT dsDNA, including testing of the DNA-enzymes, is required to test its application in molecular biology.

References

1. Miller G. P. et al. Versatile 5'-functionalization of oligonucleotides on solid support: amines, azides, thiols, and thioethers via phosphorus chemistry // *The Journal of organic chemistry*. 2004. Vol. 69 (7). P.2404–2410.
2. Stemmer W.P. et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides // *Gene*. 1995. Vol. 164 (1). P. 49–53.
3. Буренкова Ю. П. Стабильность 5'-диметокситригильной защитной группы в условиях полимеразной цепной реакции / Ю. П. Буренкова, А. И. Жолнерович, В. В. Щур, С. А. Усанов, А. В. Янцевич // XXI Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии : тезисы докладов молодежной конференции, Гатчина, 24–29 февр. 2020 г. : в 2 т. / НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ, 2020. Т. 2. С. 34–35.

СОЗДАНИЕ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К CD5 ЧЕЛОВЕКА

CREATING OF HUMAN CD5-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

А. А. Юрина

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия
Новосибирский государственный университет*

A. A. Yurina

*Institute of molecular and cellular biology SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

E-mail: a.yurina@g.nsu.ru

Аннотация

Онкологические заболевания Т-клеточного происхождения составляют большую долю гематологических заболеваний, однако характеризуются повышенной смертностью и слабо поддаются лечению. Перспективным методом лечения Т-клеточных лимфом является иммунотерапия Т- или НК-клетками с химерными антигенными рецепторами (chimeric antigen receptor, или CAR). CAR представляет собой химерную молекулу, ее внеклеточная часть распознает опухолевые антигены, а внутриклеточная запускает цитотоксическую реакцию. Одной из наиболее привлекательных мишеней для элиминации злокачественных Т-клеток является поверхностный белок CD5, однако он экспрессируется и на нормальных Т-лимфоцитах клеток, значительно затрудняя создание CAR Т-клеточного препарата. Чтобы преодолеть это ограничение, мы предлагаем использовать CAR НК-клетки со специфичностью к CD5.

Abstract

T-cell malignancies form a small part of hematological diseases, however, they are characterized by high mortality rate and treated poorly. The immunotherapy with T- or NK-cells with chimeric antigen receptors (CAR) is a prospective treatment method for T-cell lymphomas. CAR is a chimeric molecule, its extracellular part recognizes tumor antigens, and intracellular one triggers a cytotoxic reaction. One of the most attractive targets for the elimination of malignant T-cells is the surface protein CD5, but it is also expressed

on normal T-lymphocyte cells, which makes it hard to create a CAR T cell preparation. To overcome this limitation, we propose to use CD5-specific CAR NK cells.

Введение

В CAR T-терапии используются модифицированные T- или NK-клетки пациента, нацеленные на поверхностные антигены опухолевых клеток. Однако при лечении T-ALL и PTCLs возникает серьезная проблема: доступные антигены присутствуют как на поверхности опухолевых T-клеток, так и на поверхности CAR T-клеток, и нормальных T-лимфоцитах. Преодолеть это ограничение можно, используя другие модифицированные цитотоксические клетки иммунной системы — NK-клетки. NK-клетки представляют собой CD3-CD5 — цитотоксические лимфоциты. Отсутствие экспрессии CD5 делает NK-клетки подходящими для создания CD5-специфичных эф-фекторов для терапии T-клеточных неоплазий.

Таким образом, целью данной работы является создание линии NK-подобных клеток с экспрессией CD5-специфичного CAR.

Материалы и методы

Ранее в лаборатории были получены последовательности, кодирующие CD5-специфичные scFv. Указанные scFv были клонированы в лентивирусный вектор pCDH-CD8-41BBz, содержащий лидерную последовательность каппа-цепи иммуноглобулина, трансмембранный район и цитоплазматическую часть CAR второго поколения.

Следующим этапом работы была вирусная трансдукция NK-подобных клеток линии YT. Для этого клетки 293T были трансфицированы плазмидами pMD2.G, psPax2 и векторными плазмидами. Через 48 часов после трансфекции супернатанты кондиционированных сред были сконцентрированы и использованы для инфекции спинокуляцией клеток YT с MOI = 10.

Результаты

Были сконструированы два варианта CD5-специфичных CAR, отличающихся порядком расположения VH- и VL-доменов. Полученные конструкции кодируют CAR следующей структуры: scFv со специфичностью к CD5, шарнирная часть и трансмембранный район, заимствованный от CD8a, сигнальная последовательность белков 4-1BB и CD3zeta. В качестве репортеров в конструкциях использована изоформа рецептора LNGFR. Путем трансдукции клеток YT были получены две поликлональные линии, экспрессирующие CD5-специфичные CAR, и верифицирована поверхностная экспрессия. В дальнейшем будет изучена цитотоксическая активность полученных линий в отношении CD5-позитивных раковых клеток.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Абакумова Т. О.	551	Арюков А. Р.	376
Абдуллин Т. И.	233	Астафьева О. В.	3, 372
Абдуллина М. И.	218	Афоничева П. К.	5
Абдыкеримов А. Д.	185	Афонникова С. Д.	379
Абикеева Т. А.	367	Ахатова Ф. С.	7
Абрамова О. И.	462	Ахметова Р. Ф.	28
Агладзе К. И.	255	Бабич П. И.	191
Адельшин Р. В.	489	Бабышкина Н. Н.	430
Азарнова Т. О.	78, 501, 532	Багандова К. М.	95
Актанова А. А.	207	Бажан С. И.	596
Акулов А. Е.	414	Баженова Е. А.	285
Акулова Н. И.	43	Базарова Е.	401
Ал Аллаф Л.	278	Базовкина Д. В.	507, 536
Алексеев Я. И.	19	Базыкин Г. А.	591
Алексеева М. В.	52	Байгильдин С. С.	479
Алешин С. В.	38	Байков И. К.	193, 315
Алёшкин А. В.	36, 95	Балалаева И. В.	574
Алибаева Л. Ф.	202	Балыкова А. Н.	381
Аликин Ю. С.	52	Барабощкина И. А.	536
Аноприенко А. О.	332	Баранов К. В.	285
Антоневич Н. Г.	340	Баранова Д. В.	283
Антоненко А. К.	370	Баранова О. А.	177
Антонов Е. В.	536	Бардашева А. В.	154
Антонова Н. П.	36	Барлев Н. А.	572
Антропов Д. Н.	281	Бартош А. В.	9
Анурова М. Н.	36	Басова Е. Ю.	384
Аншаков Д. В.	78	Басова М. А.	196
Апарцин Е. К.	207, 374	Бауэр Т. В.	365
Арнаудова К. Ш.	372	Бах С. Н.	390
Артамонова И. И.	511	Бахарев А. А.	252
Архипова А. С.	188	Башкина Е. С.	85
Архипова В. И.	207, 374	Башмакова Е. Е.	12

Баяндин Р. Б.....	287	Вавилова В. Ю.....	401, 580
Бегановская В. А.....	15	Вагнер В. Д.....	242
Бедулина Д. С.....	509, 549	Ванков П. Я.....	67
Беленькая С. В.....	23, 392	Варламова Е. А.....	534
Белов Д. А.....	5, 19	Васильева А. В.....	34
Белов Ю. В.....	5	Васина Д. В.....	36
Белозёрв В. С.....	199, 240	Вацадзе С. З.....	392
Белостоцкий Д. Е.....	67	Вдовина Т. В.....	76
Белый Ю. Ф.....	559	Ведунова М. В.....	574
Белых Д. В.....	15	Веньямина А. Г.....	374
Березиков Е.....	401, 580	Верещагина К. П.....	489, 509
Берлина А. Н.....	505	Виноградов Д. И.....	497
Бернадо А. В.....	420	Владимиров А. П.....	252
Бирулина Ю. Г.....	202	Власов В. В.....	589
Бирюков М. Ю.....	401, 580	Волкова Н. В.....	23, 403
Бирюков М. М.....	204	Волкова Т. О.....	394
Бирюкова М. И.....	261	Волосникова Е. А.....	596
Биченкова Е. В.....	589	Вонг П.-Ф.....	285, 334, 348
Блажко Н. В.....	527	Воробьёв А. М.....	36
Блинова Е. А.....	405	Воробьёв С. Л.....	103
Бобрикова Е. Н.....	21	Вторышин С. В.....	430
Бобрукевич Д. В.....	340	Вударски Я.....	580
Богданов А. О.....	263	Высочина Г. И.....	338
Богданова А. А.....	394	Вязов Е. В.....	38
Богрянцева М. П.....	85	Гайевская Н. Е.....	332
Боева О. С.....	207, 314	Галдина В. А.....	405
Божок Г. А.....	110	Гамбург Т. А.....	408
Болдинова Е. О.....	397, 461	Ганчева П. Г.....	473
Бондаренко К. А.....	461	Гапонова С. К.....	589
Бондаренко Т. П.....	110	Гаптулбарова К. А.....	411
Борвинская Е. В.....	105	Гашникова М. П.....	327
Боргоякова М. Б.....	23	Гашникова Н. М.....	319, 327
Борисова У. П.....	436	Гендриксон О. Д.....	9
Бочарова Д. В.....	19	Гисич А. В.....	209
Бояринцева А. Ю.....	330	Гладышева А. В.....	91, 287
Брутер А. В.....	534	Глинских А. В.....	414
Буйко Е. Е.....	202	Глушаков Р. И.....	517
Булгакова А. Е.....	26	Гогонина В. И.....	293
Булынина С. С.....	28, 67	Годке П. П. Г.....	397
Бунева В. Н.....	445	Головач Е. А.....	340
Буренина О. Ю.....	399	Голосова О. И.....	524
Буренкова Ю. П.....	30, 599	Голота О. В.....	193
Буркова Е. Е.....	483	Голубев Д. А.....	416
Бычкова А. В.....	32, 218, 261	Гольшев В. М.....	212

Гомес Р.	207, 374	Доценко М. Л.	340
Гончарик Р. Г.	38	Доценко Э. А.	340
Гончаров А. Е.	340	Дреничев М.	586
Гончаров И. М.	222	Дроздова П. Б.	489
Гончарова Е. П.	408	Дронова Т. А.	430
Гончарова Т. А.	215	Дубовицкий Н. А.	290
Гордеева А. А.	418	Дубовиченко М. В.	433
Горобец М. Г.	218	Дубовский И. М.	43
Гороховатский А. Ю.	425, 475	Дудина Л. Г.	199, 240
Гражданцева А. А.	344	Думченко Н. Б.	50
Григорьева Е. В.	566	Дышлок Л. С.	97
Григорьева Е. Д.	41	Дьяконова А. Т.	436
Григорьева Л. Р.	233	Дюдеева Е. С.	441
Гризанова Е. В.	43	Евстрапов А. А.	5, 19
Грин М. А.	107	Емельянова Е. П.	293
Гунбин К. В.	457, 568, 591	Емельянова Л. А.	193, 315
Гурков А. Н.	105, 489	Ерёмин Д. В.	538
Гурьянов И. Д.	7	Ермаков Е. А.	445
Гусакова С. В.	202	Ермаков М. С.	443
Гущин В. А.	36	Ермолаев В. В.	52
Гущин И. Ю.	222	Еропкин М. Ю.	330
Давлетова К. И.	420	Ерошенко Г. А.	381
Даниленко В. Н.	511	Ерошин А. И.	56
Даниленко Д. М.	330	Ершова М. О.	450
Данилин Н. А.	584	Ефимова Ю. В.	574
Данильченко Н. В.	23	Ефременко А. В.	107
Дарнотук Е. С.	177	Ещенко Н. В.	58
Дворник Ю. В.	582	Жаркова З. В.	3, 372
де ла МатаФ. Х.	207, 374	Ждид Г. А.	295
Дёмкин В. П.	185, 267, 276	Жердев А. В.	9
Денисова Э. Н.	196	Жолнерович А. И.	599
Держалова А. С.	422	Журавлёв Е. С.	58, 154, 281, 497
Дерко А. А.	290	Журавлёва Е. А.	298
Дәкібай А. С.	44	Забавкина А. А.	170
Дзантиев Б. Б.	9	Заблуда В. Н.	505
Дзюбенко В. В.	367	Завадовский К. В.	267
Дикая В. А.	48	Задорина Е. О.	112
Димова М. Д.	489	Зажицкая М.	591
Дмитренко О. П.	462	Зайковская А. В.	23, 306
Дмитриенко Е. В.	21, 26, 160	Зайцев В. А.	225
Добронос М. А.	425	Закревский Д. Е.	204
Довыденко И. С.	183	Замалутдинов А. В.	447
Долгашева Д. С.	359, 411, 427, 487	Замосковцева А. А.	227
Донцова О. А.	399	Замятина Е. В.	293

Запрудская Е. В.	60	Каропова М. С.	126
Зарубин В. Н.	191	Каримов Д. Д.	479
Захаревич Н. В.	511	Каримов Д. О.	479
Захаренко А. Л.	586	Карпенко Л. И.	23, 540, 542, 596
Зацепин Т. С.	89, 399, 422, 485, 551	Карпова Н. С.	462
Зенкова М. А.	408, 422, 453, 514, 589	Карташов М. Ю.	80
Зеркаленкова Е. А.	447	Ким И. В.	317
Зиганшин А. М.	28, 67	Кипень В. Н.	465, 469, 553, 556
Зиганшин Д. Д.	63	Кирсанов К. И.	495
Зиганшин Р. Х.	475	Киселева И. А.	95
Зиганшина Э. Э.	28, 67	Кичкайло А. С.	505
Зилов Д. С.	69, 87	Клементьев С. В.	76
Золотухина Е. А.	78	Клименко В. П.	52
Зубков Ф. И.	306	Клочихин К. А.	250
Зулькарнеев Э. Р.	95	Клюсевич Я. А.	315
Зыбкина А. В.	300	Кнауэр Н. Ю.	207, 374
Ибрагимова М. К. ...	302, 359, 411, 427, 487	Кнорре Д. А.	568, 591
Иванов А. Д.	71	Кобелев А. В.	76
Иванов М. К.	367	Ковалева К. С.	306
Иванов О. А.	158	Коваль Л. А.	416
Иванов Ю. Д.	450, 546	Коваль О. А.	204, 443
Иванова И. А.	450	Ковтун А. С.	511
Идиятов И. И.	56, 165	Кожемякина Р. В.	507
Ильина А. А.	453	Козин С. В.	235
Ильина Е. С.	477	Козлов Д. В.	154
Ильичёв А. А.	23, 540, 596	Козлова Ю. Н.	154, 295
Ильчибаева Т. В.	536, 538	Кокорина Е. В.	302
Ильющенко Д. В.	457	Колдышева Е. В.	566
Ильясов А. Р.	229	Колосова И. В.	309
Исаева А. А.	23, 403	Колпащиков Д. М.	433
Искра Е. Л.	459	Комиссаров А. Б.	58, 154, 281
Ишемгулов А. Т.	231	Комиссаров А. С.	48, 69, 87
Ишкаева Р. А.	233	Кондаурова Е. М.	538
Кабанов А. С.	365	Кондратьев А. В.	473
Кабиров М. Р.	227	Конев В. П.	242
Каверина Г. Б.	193	Коновалова Н. И.	330
Казаринов К. Д.	177	Кононова П. А.	238
Казачинская Е. И.	403	Кононова Ю. В.	293
Казачкова Е. А.	293	Костанова Е. А.	261
Каирова М. Ж.	44	Коньшев И. В.	199, 240
Калмыкова Г. В.	43	Коняхина Ю. В.	309
Калюжная Я. Г.	461	Коптюг И. В.	414
Камалов М. И.	74	Корунова Е. С.	475
Карал-оглы Д. Д.	362	Корчагина В. А.	78

Коршунов А. С.	242	Липилкин П. В.	481
Костарной А. В.	473	Лисицына Е. С.	175
Котловская Л. Ю.	276	Литвинова Н. А.	384
Котомина Т. С.	334	Литвяков Н. В.	302, 411, 359
Кочеткова А. С.	477	Лиу Чиа-Вэй.	591
Кочиш И. И.	501	Лобанова И. Е.	338
Кочнева Г. В.	344	Логвина Н. А.	89, 485
Кошель Е. И.	170	Логвинов А. А.	162
Кошеметов Ж. К.	118	Ломзов А. А.	212, 227
Кошман В. Е.	244	Ломов Н. А.	447
Кравцов А. А.	235	Лопухова М. В.	32, 218
Кривенко А. А.	465, 469	Луговая И. С.	78, 532
Кривошеина Е. И.	80	Лукассен М.	509
Криштоп В. В.	170	Луковски С. В.	591
Крутикова Е. В.	285, 334, 348	Лукьянцев М. А.	63
Крысько Д. В.	574	Лупанова Т. Н.	140
Креницына Т. И.	43	Лутковский Р. Ю.	91
Кудояров Е. Р.	479	Луцкая Е. А.	487
Кудрявцев А. Н.	12	Мадьярова Е. В.	489
Кузин А. А.	324	Мазунин И.	591
Кулаева Е. Д.	481	Мазуркова Н. А.	338
Кулешов И. В.	82, 172	Макаров Г. И.	491
Кулешова А. Е.	483	Макарова А. В.	397, 461
Куликов Е. А.	38	Макарова Т. М.	493
Куликова Е. А.	507, 536	Максимов В. И.	532
Кунц В. С.	591	Максимова В. П.	495
Кураченко Ю. А.	196	Мальсагова К. А.	246
Курбатов Л. К.	281	Марданова А. М.	499
Курочкин И. И.	551	Марков А. В.	453, 514
Курская О. Г.	336	Марков О. В.	408, 422
Куртанов Х. А.	436	Мархаев А. Г.	290
Курятников К. Н.	242	Мастова А. В.	248
Куцейкин С. С.	521	Матвеев А. Л.	315
Куцерубова Н. С.	85	Матвеев Л. Е.	315
Кучур П. Д.	87	Матвеева А. М.	497
Лаврентьева И. Н.	362	Матюшенко В. А.	334
Лаврик О. И.	477, 586	Махалова К. И.	584
Лавров Г. С.	19	Мехтиев Е. Р.	36
Лага В. Ю.	312	Маццишина Н. В.	317
Лазаревич Н. Л.	399	Медведев Д. С.	530
Лактионов П. П.	503	Мельничук В. С.	267
Лепехина Д. Ю.	312	Меркульева Ю. А.	93, 156
Легута С. Н.	231	Метальников П. В.	473
Линь Цу-Кунг.	591	Мизаева Т. Э.	95

Микрюкова Т. П.....	80	Немгарев А. В.....	233
Милаёва И. В.....	270	Несмеянова В. С.....	23
Милентьева И. С.....	97	Нетесов С. В.....	521
Минич Я. С.....	340	Нефедьева М. В.....	322
Миннуллина Л. Ф.....	499	Нечаева Е. А.....	85
Миргородская О. А.....	577	Низамов Т. Р.....	229
Миронов В. Ф.....	233	Никитин М. С.....	511
Мирославская Н. А.....	397	Никишов О. Н.....	324
Мистерова А. В.....	100	Никольская Е. Д.....	15, 107, 150, 162, 181
Митин Д. Е.....	250	Никонорова В. Г.....	170
Михайленко Ю. А.....	252	Новикова О. А.....	112
Михайлов С. Н.....	586	Новикова О. Ю.....	110
Михайлова А. А.....	591	Новопашина Д. С.....	281
Михайлова А. Г.....	591	Ножкина О. А.....	115, 126
Мищенко Т. А.....	574	Нурбеков М. К.....	462
Моисеева М. В.....	74	Нуштаева А. А.....	443
Мокрушина Ю. А.....	475	Ныров В. А.....	517
Моляева М. Р.....	15, 150, 162, 181	Одаренко К. В.....	514
Молодых О. П.....	566	Октябрьский В. П.....	258
Молчан О. В.....	60	Окулова И. И.....	353
Монстакова Т. В.....	501	Омаров Р. Т.....	44
Мординова Е. Д.....	283	Оразымбетова Н. К.....	118
Морозова В. В.....	154, 295	Орешков С.....	591
Морозова Е. Е.....	503	Орлова Л. А.....	23
Морозова Н. Б.....	107	Осипов И. Д.....	521
Морячков Р. В.....	505	Осипова И. П.....	327
Москалёв А. А.....	416	Остромышенский Д. И.....	48
Москалюк В. С.....	507	Павлова Н. И.....	436
Мошетова Л. К.....	462	Павлюк А. М.....	74
Мурадова А. Г.....	261	Панкратов А. А.....	107
Мурашкина Т. А.....	290	Панкратов Ю. В.....	263
Мурылёва А. А.....	103	Панов А. В.....	107
Мустафаса А. С.....	346	Панферов Е. В.....	517
Мутин А. Д.....	509	Парамоник А. П.....	521
Мутон С.....	580	Паталяк С. В.....	430
Назаренко В. В.....	222	Патракова Е. А.....	204
Назарова А. А.....	105	Патрин М. М.....	465, 469
Налимова Т. М.....	319	Патутина О. А.....	589
Науменко В. С.....	507, 536, 538	Пацюркевич А. А.....	495
Науменко Е. А.....	7	Пашкевич С. Н.....	231
Наханова Г. Д.....	118	Пашкина Е. А.....	207, 374
Невинский Г. А.....	445	Пашковский С. Е.....	527
Недорезова Д. Д.....	41	Певзнер А. М.....	487
Немова Н. Н.....	394	Переверзев И. М.....	524

Пермякова Н. В.	168	Реймонд А.	591
Перфильева А. И.	115, 126	Реиноите Ф.	580
Петрова И. В.	202	Ремсева А. А.	222
Петрова П. А.	330	Рыжиков Ю. Л.	222
Петровская О. Д.	129	Рихтер В. А.	154
Петухова Е. А.	563	Родионов Е. О.	411
Печерицын А. А.	215	Родионова М. Д.	534
Плешакова Т. О.	450	Родный А. Я.	536, 538
Плешков М. О.	185, 225	Романова С. Г.	255
Плотников К. О.	527	Романовская-Романко Е. А.	346
Плотникова Е. А.	107	Рубцов М. А.	447
Погожова М. П.	332	Рубцова М. П.	399
Подгорная О. И.	48	Рудомётов А. П.	23, 540, 596
Подгурская А. Д.	255	Рудомётова Н. Б.	540, 542
Подлесных С. В.	418	Румянцев А. В.	544
Подругина Т. А.	162	Рыболовлев И. Н.	559
Поздеева А. А.	319	Рында Е. Г.	340
Покровский В. С.	32	Рябина В. А.	527
Политко М. О.	566	Рязанцева Л. Т.	258
Поляков Н. Э.	188, 238, 244, 248	Сабуров А. С.	140
Полякова А. А.	530	Саввина О. А.	384
Пономарев Д. В.	233	Савюк М. О.	574
Пономарева Е. П.	91	Сагитова Г. Р.	495
Попадьин К. Ю.	457, 568, 591	Садовая Т. А.	546
Прадеепкумар П. И.	397	Садыкова Э. З.	261
Приказчикова Т. А.	551	Саламайкина С. А.	142
Прокопенко П. И.	334	Салахия Д. В.	74
Прокопьева Е. А.	336	Салахутдинов Н. Ф.	283, 306, 453, 514
Протасов А. В.	577	Салихова Т. И.	233
Протопопова Е. В.	287	Саломатина О. В.	453, 514
Проценко М. А.	338	Сандарева Т. П.	319
Птицын А. А.	258	Санчес-Ньевес Х.	207, 374
Пулкина А. А.	346	Сапельников М. Д.	107
Пурвиньш Л. В.	483	Саранчина А. Е.	549
Пушкарев И. А.	133	Сарсембаев Х. С.	145
Пышный Д. В.	212, 227	Святченко В. А.	287
Пьянков О. В.	306, 344	Сейсенбаева М. С.	118
Пьянков С. А.	80, 365	Селезнев А. А.	327
Пьячентини М.	572	Селищев Д. С.	154
Рагад А.	233	Селищева А. А.	38
Разумов И. А.	414	Селютина О. Ю.	188, 238, 244, 248
Ракин А. И.	376	Семенова А. В.	344
Резвых А. М.	532	Семиколонова О. А.	584
		Сенькова А. В.	514

Сербина А. В.	263	Строкотов Д. И.	209
Сергеев А. А.	309, 365	Стронин О. В.	315
Сергеева М. В.	58, 154, 346	Студеникина А. А.	420
Сергеева О. В.	551	Стукова М. А.	346
Серебрянникова Е. С.	293	Субботина К. В.	561
Сиволобова Г. Ф.	344	Суворов Д. А.	250
Сингх П.	503	Суворова А. А.	290
Синебрюхова А. М.	177	Суворова Ю. В.	563
Синявский Ю. А.	145	Сухов Б. Г.	126
Сироткин А. С.	63, 76	Суховских А. В.	566
Слижов П. А.	517	Суюндукова А. Т.	267
Слита А. В.	103	Сюткина А. С.	112, 353
Слотвицкий М. М.	255	Танака М.	591
Слущанко Н. Н.	425	Тананыкина Е. К.	572
Смирнова Е. Ю.	546	Таранов О. С.	403
Снытгов Е. В.	465, 469, 553, 556	Тараскин А. С.	577
Снытникова О. А.	414	Тартаковская Д. И.	559
Собко О. А.	317	Телегина Ю. В.	52
Соболев И. А.	336	Терещенко Д. С.	43
Сокол А. Д.	568	Терещенко Е. Г.	158
Сокол М. Б.	15, 150, 162, 181	Терновой В. А.	80, 91
Соколов А. Е.	505	Тикунов А. Ю.	295
Соколов Д. К.	566	Тикунова Н. В.	193, 295, 315
Соколова А. С.	283, 542	Тимонина В. Н.	568
Соколова Л. М.	193	Тимофеев М. А.	105, 489, 509
Соколова М. В.	473	Тимохина О. В.	340
Соловьёва А. И.	142	Тимошников В. А.	188, 244
Соловьёва М. И.	154	Титов И. А.	322
Соловьёва Э. Ю.	177	Тиунов А. В.	524
Соломатина М. В.	336	Тишакова К. В.	544
Сорокина Ю. В.	559	Торгашева Н. А.	524
Сотников Д. В.	9	Тотменин А. В.	319, 327
Спивак И. М.	517	Травина А. О.	48
Спиридонова В. А.	505	Тремасова А. М.	56
Старожилова К. В.	156	Третьяков Е. О.	568, 591
Старостина Е. В.	23	Троицкая О. С.	204
Старцева О. М.	15	Туркина К. И.	462
Степанов Г. А.	58, 154, 281, 497	Турубанова В. Д.	574
Степанова А. Ю.	142	Тюлин А. А.	577
Степанова Е. А.	285, 334, 348	Тюлина В. В.	270
Стеценко Д. А.	422, 485	Тюфяков В. С.	353
Стойнова А. М.	175	Удуг В. В.	276
Стонимская Е. М.	430	Уласов А. В.	140
Стрельцова Я. Б.	350	Умуралиев Б. К.	118

Усалка О. Г.	495	Цыцорина И. А.	293
Усанов С. А.	30, 599	Чеканов А. В.	177
Усова С. В.	85	Чепурных Т. В.	425, 475
Устьянцев К. В.	401, 580	Червякова О. В.	118
Ушаков В. С.	566	Чердынцева Н. В.	430
Ушакова К.	591	Черемихина О. В.	359
Фабушева К. М.	582	Черешнев В. О.	82, 172
Фазлыева А. С.	479	Чернышова И. А.	586
Фарберов Л.	89	Чиглинцева Д. А.	589
Фахруллин Р. Ф.	7	Чижикова А. И.	175
Федин А. И.	177	Чистякова А. К.	334, 348
Фелле Ж.	591	Чуб Е. В.	91
Филиппова Е. И.	338	Чубаров А. С.	250
Фисенко П. В.	317	Шайдуллина Э. Р.	499
Фокина А. А.	422	Шаманский В. А.	591
Фоменко В. К.	160	Шамсутдинова О. А.	362
Фомичёва М. В.	15, 150, 162, 181	Шаньшин Д. В.	23, 392
Франк Л. А.	12	Шаповал А. И.	418
Фрицлер Я. В.	274	Шаповалова А. И.	594
Фролова Ш. Р.	255	Шарабрин С. В.	596
Фуджи М.	422	Шаршов К. А.	290
Хабардина Е. А.	485, 584	Шастина Н. С.	177
Хабирова С. Р.	165	Швалов А. Н.	319, 327
Харитоновна Е. М.	312	Шевелев Г. Ю.	183, 524
Хачатрян Д. С.	32	Шестопалов А. М.	290, 293
Хейман Т.	589	Шиохама Я.	422
Ходырева С. Н.	477	Шипелова А. В.	177
Хозсева С. А.	168	Шомрон Н.	89
Хорошавин Ю. А.	356	Шуваев А. Н.	274
Храпко К.	591	Шувалов О. Ю.	572
Хрипко О. П.	293	Шукуров Р. Р.	384
Худяева И. С.	15	Шунялов А. В.	491
Хуснутдинова Н. Ю.	479	Шуралев Э. А.	165
Хуцишвили С. С.	115	Шчапова Е. П.	105
Царькова А. С.	475	Щелконогов В. А.	177
Царькова М. С.	270	Щелкунов С. Н.	309, 365
Цвеляя В. А.	255	Щербаков Д. Н.	23, 93, 156, 283, 300, 306, 392, 403, 540, 542
Цветикова С. А.	170	Щербакова Н. С.	542
Центалович Ю. П.	414	Щетникова Е. А.	390
Цепаева О. В.	233	Щур В. В.	30, 599
Циммерман Е. Л.	334	Юрина А. А.	602
Цыбулина А. О.	276	Яббаров Н. Г.	15, 150, 162, 181
Цыганов М. М.	302, 359, 411, 427, 487	Якоб Л.	509
Цыденова И. А.	359		

Яковлева Д. В.	416	Янцевич А. В.	30, 599
Яковлева К. И.	183	Яровая О. И.	283, 306, 392, 542
Якубицкий С. Н.	365	Ястребова Е. С.	209
Якубовская М. Г.	495		
Якубовская Р. И.	107		
Якунина М. Н.	32		
Ялчина Р. С.	551		
Ямпольский И. В.	425, 475		

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

- Астафьева О. В., Жаркова З. В.** ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПАСЛЕНА ЧЕРНОГО С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ ПИЩЕВОГО КОНСЕРВАНТА 3
- Афоничева П. К., Белов Д. А., Белов Ю. В., Евстрапов А. А.** ОПЫТ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНАТОРА В КИТАЕ 5
- Ахатова Ф. С., Науменко Е. А., Гурьянов И. Д., Фахруллин Р. Ф.** СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В СОЧЕТАНИИ С НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ СМАРТ-СКАФФОЛДАМИ КАК ИНСТРУМЕНТ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ 7
- Бартош А. В., Сотников Д. В., Гендриксон О. Д., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.** РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АНТИБИОТИКОВ: СВОЙСТВА ИММУНОРЕАГЕНТОВ И ВЫБОР ФОРМАТА АНАЛИЗА 9
- Башмакова Е. Е., Кудрявцев А. Н., Франк Л. А.** СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОМАРКЕРА MIA БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ 12
- Бегановская В. А., Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Молляева М. Р., Фомичёва М. В., Худяева И. С., Белых Д. В., Старцева О. М., Никольская Е. Д.** НОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ PLGA С ХЛОРИНОМ E6 ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ 15

Белов Д. А., Бочарова Д. В., Лавров Г. С., Алексеев Я. И., Евстрапов А. А. СМЕНЯЕМОСТЬ ТЕХНОЛОГИЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК	19
Бобрикова Е. Н., Дмитриенко Е. В. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ С РЕГУЛИРУЕМЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ СМЕШЕННОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА И ЕГО КОМПОЗИТОВ	21
Боргоякова М. Б., Карпенко Л. И., Рудомётов А. П., Шаньшин Д. В., Беленькая С. В., Исаева А. А., Несмеянова В. С., Волкова Н. В., Щербаков Д. Н., Старостина Е. В., Зайковская А. В., Данильченко Н. В., Орлова Л. А., Ильичёв А. А. ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА НА ДНК-КОНСТРУКЦИИ ПРОТИВ АКТУАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ.....	23
Булгакова А. Е., Дмитриенко Е. В. ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТЯЖЕННЫХ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО КНИ- БИОСЕНСОРА	26
Булынина С. С., Зиганшина Э. Э., Ахметова Р. Ф., Зиганшин А. М. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> AM-02.....	28
Буренкова Ю. П., Щур В. В., Усанов С. А., Янцевич А. В. ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ <i>BOS BOVIS</i>	30
Бычкова А. В., Якунина М. Н., Лопухова М. В., Покровский В. С., Хачатрян Д. С. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И КОНТРАСТНЫЕ СВОЙСТВА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ	32
Васильева А. В. РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ УПАКОВКИ «EAT PACK».....	34
Воробьёв А. М., Анурова М. Н., Алёшкин А. В., Гуцин В. А., Васина Д. В., Антонова Н. П., Мехтиев Е. Р. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ГЕЛЯ С АРТИЛИЗИНОМ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ	36

- Вязов Е. В., Гончарик Р. Г., Куликов Е. А., Алешин С. В., Селищева А. А.**
 ФОТОЗАВИСИМОЕ РАЗРУШЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА А
 В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ АСТАКСАНТИНА,
 ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КЛЕТОК *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*38
- Григорьева Е. Д., Недорезова Д. Д.** АНАЛИТ-ЗАВИСИМАЯ
 АКТИВАЦИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АНТИСМЫСЛОВОЙ ДНК41
- Гризанова Е. В., Терещенко Д. С., Криницына Т. И., Калмыкова Г. В.,
 Акулова Н. И., Дубовский И. М.** ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ
 В КИШЕЧНИКЕ ЛИЧИНОК КОЛОРАДСКОГО ЖУКА
LEPTINOTARSA DECEMLINEATA ПРИ РАЗВИТИИ
 БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ *BACILLUS THURINGIENSIS*43
- Дэкібай А. С., Каирова М. Ж., Омаров Р. Т.**
 БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ
 РАЗМНОЖЕНИЕ *PINUS SYLVESTRIS L.*44
- Дикая В. А., Травина А. О., Остромышенский Д. И., Подгорная О. И.,
 Комиссаров А. С.** АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА
RANA TEMPORARIA НА РАННИХ СТАДИЯХ ЭМБРИОГЕНЕЗА48
- Думченко Н. Б.** КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
 ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПАНДЕМИЧЕСКИХ
 КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ВАКЦИН50
- Ермолаев В. В., Аликин Ю. С., Телегина Ю. В., Клименко В. П.,
 Алексеева М. В.** ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ
 И ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СРЕДСТВ
 НА ОСНОВЕ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК52
- Ерошин А. И., Идиятов И. И., Трemasова А. М.** ЭНДОФИТНЫЕ
 МИКРООРГАНИЗМЫ: ПЕРСПЕКТИВА ПОВЫШЕНИЯ
 ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ КОРМОВ56
- Ещенко Н. В., Сергеева М. В., Журавлёв Е. С., Комиссаров А. Б.,
 Степанов Г. А.** CRISPR/CAS9 ОПОСРЕДОВАННЫЙ НОКАУТ
 ГЕНА *IFITM3* В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА58
- Запрудская Е. В., Молчан О. В.** ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ
 ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ
 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА60

Зиганшин Д. Д., Лукьянцев М. А., Сироткин А. С. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОФУНГИЦИДА ОРГАМИКА Ф ДЛЯ ТОМАТА ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА.....	63
Зиганшина Э. Э., Белостоцкий Д. Е., Булынина С. С., Ванков П. Я., Зиганшин А. М. АНАЭРОБНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПРОЦЕСС СОВМЕСТНОЙ КОНВЕРСИИ ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЫ И СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА.....	67
Зилов Д. С., Комиссаров А. С. CONTERA: ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ПАНГЕНОМНЫХ ДАННЫХ	69
Иванов А. Д. ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОШЕДШИХ БИОРЕМЕДИАЦИЮ И ОБОГАЩЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЮ <i>CHLORELLA VULGARIS</i> СТОЧНЫХ ВОД В ГИДРОПОННОЙ СИСТЕМЕ.....	71
Камалов М. И., Павлюк А. М., Моисеева М. В., Салахиева Д. В. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОАКТИВНОСТИ АМФИПАТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ	74
Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С., Вдовина Т. В. ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛЕКТИНОВ БАКТЕРИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК В ПРОЦЕССАХ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД.....	76
Корчагина В. А., Азарнова Т. О., Луговая И. С., Золотухина Е. А., Аншаков Д. В. РОЛЬ L-КАРНИТИНА В СИСТЕМЕ ПОВЫШЕНИЯ ХОЗЯЙСТВЕННО-ПОЛЕЗНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЯИЧНЫХ КУР В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ	78
Кривошеина Е. И., Карташов М. Ю., Микрюкова Т. П., Пьянков С. А., Терновой В. А. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Е ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ.....	80
Кулешов И. В., Черешнев В. О. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОТРАЖЕННЫХ И МАЛОКРАТНО РАССЕЯННЫХ ФОТОНОВ НА ПРОЦЕСС ПОСТРОЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ В ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ.....	82

- Кучерубова Н. С., Усова С. В., Башкина Е. С., Богрянцева М. П., Нечаева Е. А. ВАЛИДАЦИЯ СИСТЕМЫ ВОДОПОДГОТОВКИ И ВОДЫ ИНЪЕКЦИОННОЙ В ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА.....85**
- Кучур П. Д., Зидов Д. С., Комиссаров А. С. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ О-АНТИГЕН СВЯЗАННЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМАХ БАКТЕРИЙ87**
- Логвина Н. А., Н. Шомрон, Л. Фарберов, Зацепин Т. С. МИКРОРНК-ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СПЛАЙСИНГА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 89**
- Лутковский Р. Ю., Терновой В. А., Пономарева Е. П., Гладышева А. В., Чуб Е. В. ОБНАРУЖЕНИЕ РНК SARS-COV-2 У БОЛЬНЫХ COVID-19 И БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МЕТОДАМИ ЦИФРОВОЙ ПЦР И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ91**
- Меркульева Ю. А., Щербаков Д. Н. РАЗРАБОТКА ПАНЕЛИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ОРТОПОКСВИРУСОВ ДЛЯ ОТБОРА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ..... 93**
- Мизаева Т. Э., Багандова К. М., Алёшкин А. В., Киселева И. А., Зулкарнеев Э. Р. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОКТЕЙЛЯ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ САЛЬМОНЕЛЛ С ПОВЕРХНОСТИ КУРИНОГО ФИЛЕ95**
- Милентьева И. С., Дышлюк Л. С. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ 97**
- Мистерова А. В. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА РОСТА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА RHPDGF-BB100**
- Мурылёва А. А., Слита А. В., Воробьёв С. Л. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА103**
- Назарова А. А., Шчапова Е. П., Гурков А. Н., Борвинская Е. В., Тимофеев М. А. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГО ОТВЕТА**

АМФИПОД НА ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕМОЦИТОВ	105
Никольская Е. Д., Сапельников М. Д., Морозова Н. Б., Плотникова Е. А., Панкратов А. А., Ефременко А. В., Панов А. В., Грин М. А., Якубовская Р. И. ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ PLGA, СОДЕРЖАЩИХ ДИПРОПОКСИБАКТЕРИОПУРПУРИНИМИД, В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ.....	107
Новикова О. Ю., Божок Г. А., Бондаренко Т. П. ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК-ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ИЗ ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ВИБРИССЫ КРОЛИКА ИНДУЦИРОВАТЬСЯ В НЕЙРОНАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ	110
Новикова О. А., Сюткина А. С., Задорина Е. О. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫБРАННЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭНДОМЕТРИТОВ У КОРОВ	112
Ножкина О. А., Перфильева А. И., Хуцишвили С. С. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАРГАНЦА В СРЕДЕ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>SOLANUM TUBEROSUM L. IN VITRO</i>.....	115
Оразымбетова Н. К., Сейсенбаева М. С., Наханова Г. Д., Кошеметов Ж. К., Умуралиев Б. К., Червякова О. В. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА.....	118
Перфильева А. И., Ножкина О. А., Каропова М. С., Сухов Б. Г. ВЛИЯНИЕ НАНОКОПОЗИТОВ СЕЛЕНА В ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦАХ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ	126

- Петровская О. Д.** ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ
ГЕРБИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО
ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА
В ПОЧВЕННЫХ МИКРОЭКОСИСТЕМАХ 129
- Пушкарев И. А.** ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ РЕМОНТНОГО МОЛОДНЯКА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ
РАЗНЫХ ДОЗ ТКАНЕВОГО БИОСТИМУЛЯТОРА..... 133
- Сабуров А. С., Лупанова Т. Н., Уласов А. В.** ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ
ПРИСОЕДИНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА
NRF2 К МОДУЛЬНОМУ НАНОТРАНСПОРТЕРУ
ПОСРЕДСТВОМ ЛЕЙЦИНОВОЙ МОЛНИИ..... 140
- Саламайкина С. А., Соловьёва А. И., Степанова А. Ю.** ЭФФЕКТ
УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
IN VITRO КУЛЬТУР НА СООТНОШЕНИЕ ОСНОВНЫХ
ФЛАВОНОВ *SCUTELLARIA BAICALENSIS* 142
- Сарсембаев Х. С., Синявский Ю. А.** КОБЫЛЬЕ МОЛОКО
В РАЗРАБОТКЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ
СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ..... 145
- Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Молляева М. Р., Фомичёва М. В.,
Никольская Е. Д.** КОНЪЮГАТРЕКОМБИНАНТНОГО ТРЕТЬЕГО
ДОМЕНА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ
ПЛГА С ПАКЛИТАКСЕЛОМ: ФАРМАКОКИНЕТИКА
И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ..... 150
- Соловьёва М. И., Селищев Д. С., Степанов Г. А., Журавлёв Е. С.,
Сергеева М. В., Комиссаров А. Б., Морозова В. В.,
Бардашева А. В., Козлова Ю. Н., Рихтер В. А., Козлов Д. В.**
ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ
БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ НА ПОВЕРХНОСТИ
САМООЧИЩАЮЩИХСЯ ТКАНЕВЫХ МАТЕРИАЛОВ..... 154
- Старожилова К. В., Меркульева Ю. А., Щербаков Д. Н.**
КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО
СТАБИЛЬНУЮ ПРОДУКЦИЮ ФОСФОЛИПАЗЫ
С *BACILLUS THURINGIENSIS* В *BACILLUS SUBTILIS*..... 156

Терещенко Е. Г., Иванов О. А. ПОТЕНЦИАЛ <i>PHYSCOMITRELLA RATENS</i> КАК ИСТОЧНИКА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	158
Фоменко В. К., Дмитриенко Е. В. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НЕОРГАНИЧЕСКИХ И КОМПОЗИТНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ.....	160
Фомичёва М. В., Подругина Т. А., Логвинов А. А., Никольская Е. Д., Молляева М. Р., Сокол М. Б., Яббаров Н. Г. СТРУКТУРНЫЙ ДИЗАЙН КОМПЛЕКСОВ РТ(II) НА ОСНОВЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ КАРБОПЛАТИНА ДЛЯ СОЗДАНИЯ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ	162
Хабирова С. Р., Идиятов И. И., Шуралев Э. А. ГИДРОЛАЗЫ КАК ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ БОРЬБЫ С ТОКСИГЕННЫМИ МИКРОМИЦЕТАМИ	165
Хозеева С. А., Пермьякова Н. В. ОСОБЕННОСТИ НОКАУТАГЕНОВ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ПРИ ПОМОЩИ РНП-КОМПЛЕКСОВ.....	168
Цветикова С. А., Забавкина А. А., Никонорова В. Г., Криштоп В. В., Кошель Е. И. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА КОЛАНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОРГАНИЗМ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	170
Черешнев В. О., Кулешов И. В. СТРУКТУРИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ В ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ИНТЕНСИВНОСТИ ПИКСЕЛЕЙ	172
Чижикова А. И., Лисицына Е. С., Стойнова А. М. РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВОЙ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	175
Щелконогов В. А., Шипелова А. В., Синебрюхова А. М., Дарнотук Е. С., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Казаринов К. Д., Соловьёва Э. Ю., Федин А. И. НАНОФОРМЫ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ.....	177

**Яббаров Н. Г., Сокол М. Б., Никольская Е. Д., Молляева М. Р.,
Фомичёва М. В. ЛЕГКО-МОДИФИЦИРУЕМЫЕ МНОГОЦЕЛЕВЫЕ
НАНО-НОСИТЕЛИ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ
НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ 181**

**Яковлева К. И., Довыденко И. С., Шевелев Г. Ю.
ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПОДХОДЫ
К СНИЖЕНИЮ УРОВНЯ ОШИБОЧНОСТИ В СОСТАВЕ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ СБОРКИ
ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ183**

РАЗДЕЛ 2

ВИРУСОЛОГИЯ

**Абдыкеримов А. Д., Дёмкин В. П., Плешков М. О.
АКТИВАЦИЯ ОТОЛИТОВОГО АППАРАТА
ВО ВРЕМЯ ТЕСТА ИМПУЛЬСА ГОЛОВЫ185**

**Архипова А. С., Тимошников В. А., Селютина О. Ю., Поляков Н. Э.
ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ТИОСЕМИКАРБАЗОНА DR44MT И ЕГО КОМПЛЕКСОВ
С ИОНАМИ ЦИНКА МЕТОДАМИ ЯМР И ХПЯ188**

**Бабич П. И., Зарубин В. Н. УПРАВЛЕНИЕ БИОПРОЦЕССАМИ
ПУТЕМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭМП НА ИХ БИОРИТМЫ191**

**Байков И. К., Емельянова Л. А., Голота О. В., Соколова Л. М.,
Каверина Г. Б., Тикунова Н. В. СТРУКТУРНЫЙ ДИЗАЙН
АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
С ЦЕЛЬЮ РАСШИРЕНИЯ ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТИ193**

**Басова М. А., Денисова Э. Н., Кураченко Ю. А.
РАСЧЕТ ДОЗОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ КОНВЕРСИИ
ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ С КОРМОМ
РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ ЙОДА
В ОРГАНИЗМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА196**

Белозёров В. С., Конышев И. В., Дудина Л. Г. СИЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО», ОЦЕНЕННЫЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	199
Бирулина Ю. Г., Буйко Е. Е., Алибаева Л. Ф., Петрова И. В., Гусакова С. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ОТВЕТА МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ В МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА.....	202
Бирюков М. М., Патракова Е. А., Коваль О. А., Троицкая О. С., Закревский Д. Е. ХОЛОДНАЯ ПЛАЗМЕННАЯ СТРУЯ КАК НОВЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОДХОД.....	204
Боева О. С., Кнауэр Н. Ю., Пашкина Е. А., Актанова А. А., Архипова В. И., Санчес-Ньевес Х., де ла Мата Ф. Х., Гомес Р., Апарцин Е. К. ОЦЕНКА ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМФИФИЛЬНЫХ ТРИАЗИН-КАРБОСИЛАНОВЫХ ДЕНДРОНОВ.....	207
Гисич А. В., Ястребова Е. С., Строкотов Д. И. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВНОГО ВОЗРАСТА ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ	209
Гольшев В. М., Ломзов А. А., Пышный Д. В. СОЗДАНИЕ ПОДХОДОВ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.....	212
Гончарова Т. А., Печерицын А. А. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОПТИМАЛЬНЫХ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СОБАК ПОРОДЫ РОТВЕЙЛЕР	215
Горобец М. Г., Абдуллина М. И., Лопухова М. В., Бычкова А. В. ОЦЕНКА ГЕНЕРАЦИИ АФК НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ, ОБЛАДАЮЩИХ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ	218

- Гушин И. Ю., Ремеева А. А., Гончаров И. М., Назаренко В. В., Рыжиков Ю. Л.** СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СЕНСОРНОЙ ГИСТИДИН-КИНАЗОЙ 222
- Зайцев В. А., Плешков М. О.** ПРОБЛЕМЫ СРАВНЕНИЯ СИСТЕМ ЭЛЕКТРООКУЛОГРАФИИ И ВИДЕООКУЛОГРАФИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ТЕСТА ИМПУЛЬСА ГОЛОВЫ 225
- Замосковцева А. А., Ломзов А. А., Кабилов М. Р., Пышный Д. В.** ПОИСК НОВОГО ТИПА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА 227
- Ильясов А. Р., Низамов Т. Р.** СРАВНЕНИЕ И АНАЛИЗ РАЗЛИЧИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МАГНИТНЫХ НАОЧАСТИЦ *IN VITRO* 229
- Ишемгулов А. Т., Летуга С. Н., Пашкевич С. Н.** ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ УДАРНЫХ ВОЛН НА МИКРООРГАНИЗМЫ В РАСТВОРАХ С СЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ 231
- Ишкаева Р. А., Салихова Т. И., А. Рагад, Цепаева О. В., Григорьева Л. Р., Пономарев Д. В., Немтарев А. В., Миронов В. Ф., Абдуллин Т. И.** ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ ЗОНДАМИ 233
- Козин С. В., Кравцов А. А.** ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО D/H-СОСТАВА СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА 235
- Кононова П. А., Селютин О. Ю., Поляков Н. Э.** ВЛИЯНИЕ ЭМОДИНА НА РЕАКЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ 238
- Коньшев И. В., Белозёров В. С., Дудина Л. Г.** ОЦЕНКА СИЛ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ «БАКТЕРИЯ — АНТИТЕЛО» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ 240

Коршунов А. С., Конев В. П., Вагнер В. Д., Курятников К. Н. ИЗУЧЕНИЕ СКОРОСТИ СОЗРЕВАНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА ЭМАЛИ ЗУБОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ НАРУШЕННОМ АМЕЛОГЕНЕЗЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	242
Кошман В. Е., Селютина О. Ю., Тимошников В. А., Поляков Н. Э. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ С УЧАСТИЕМ ХЕЛАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ТИОСЕМИКАРБАЗОНОВ	244
Мальсагова К. А. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА РАННИХ СТАДИЯХ	246
Мастова А. В., Селютина О. Ю., Поляков Н. Э. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ НИФЕДИПИНА С ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТОЙ.....	248
Митин Д. Е., Суворов Д. А., Клочихин К. А., Чубаров А. С. КОНТРАСТНЫЕ АГЕНТЫ НА ОСНОВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И НИТРОКСИДОВ ДЛЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ	250
Михайленко Ю. А., Владимиров А. П., Бахарев А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ СПЕКЛ-ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ	252
Подгурская А. Д., Слотвицкий М. М., Цвеляя В. А., Фролова Ш. Р., Романова С. Г., Агладзе К. И. ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ АРИТМОГЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВОГО ДОНОРА	255
Птицын А. А., Рязанцева Л. Т., Октябрьский В. П. ВЛИЯНИЕ ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ТРАНСПОРТА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЛЕЙКОЦИТЫ НА АКТИВАЦИЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ	258

- Садыкова Э.З., Костанова Е.А., Бирюкова М.И., Мурадова А.Г., Бычкова А.В.** ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА С ПОВЕРХНОСТЬЮ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ261
- Сербина А. В., Богданов А. О., Панкратов Ю. В.** НАРУШЕНИЕ ПЛАСТИЧНОСТИ СИНАПСОВ В ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬНЫМ СТРЕССОВЫМ РАССТРОЙСТВОМ263
- Суюндукова А. Т., Мельничук В. С., Дёмкин В. П., Завадовский К. В.** ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО РЕЗЕРВА КРОВОТОКА В КОРОНАРНЫХ СОСУДАХ МЕТОДОМ ЛОКАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ267
- Тюлина В. В., Милаёва И. В., Царькова М. С.** ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МОЛОКА КОЗ В ПЕРВЫЕ ДВЕ НЕДЕЛИ ЛАКТАЦИИ270
- Фрицлер Я.В., Шуваев А.Н.** МОДЕЛЬ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТКИ ПУРКИНЬЕ274
- Цыбулина А. О., Котловская Л. Ю., Дёмкин В. П., Удут В. В.** ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ГЕМОСТАЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕОРИИ НЕЧЕТКИХ МНОЖЕСТВ276

раздел 3

БИОФИЗИКА

- Ал Аллаф Л.** ПРОТЕЙНЫЙ БАКТЕРИОФАГ PM16 ИНДУЦИРУЕТ АДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ278
- Антропов Д.Н., Журавлёв Е.С., Комиссаров А.Б., Курбатов Л.К., Новопашина Д.С., Степанов Г.А.** РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ РНК ГРИППА А И КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОКОЛА ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ 281

Баранова Д. В., Соколова А. С., Яровая О. И., Щербаков Д. Н., Мордвинова Е. Д., Салахутдинов Н. Ф. ПРОИЗВОДНЫЕ (1S)-(+)-КАМФОРА-10-СУЛЬФОКИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ФИЛОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ	283
Вонг П.-Ф., Крутикова Е. В., Баженова Е. А., Баранов К. В., Степанова Е. А. ПОЛУЧЕНИЕ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА ГРИППА В С ХИМЕРНЫМ ГЕМАГГЛЮТИНИНОМ НА ОСНОВЕ ЛИНИЙ ВИКТОРИЯ И ЯМАГАТА.....	285
Гладышева А. В., Баяндин Р. Б., Протопопова Е. В., Святченко В. А. ИЗОЛЯЦИЯ, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХ НОВЫХ ШТАММОВ ВИРУСА НГАРИ, ОБНАРУЖЕННЫХ В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ В ГВИНЕЕ.....	287
Дерко А. А., Дубовицкий Н. А., Мархаев А. Г., Мурашкина Т. А., Суворова А. А., Шаршов К. А., Шестопалов А. М. АБУЛАВИРУСЫ ПТИЦ, ВЫЯВЛЕННЫЕ ВО ВРЕМЯ МОНИТОРИНГА ВИРУСОВ ГРИППА А НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ В 2019 Г.....	290
Емельянова Е. П., Кононова Ю. В., Замятина Е. В., Казачкова Е. А., Хрипко О. П., Цыцорина И. А., Серебренникова Е. С., Гогонина В. И., Шестопалов А. М. СЛУЧАИ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 У НОВОРОЖДЕННЫХ В НОВОСИБИРСКЕ.....	293
Ждид Г. А., Морозова В. В., Козлова Ю. Н., Тикун А. Ю., Тикун А. Ю., Тикун А. Ю. ОРИГИНАЛЬНЫЙ БАКТЕРИОФАГ ENTEROVACTER, EC151	295
Журавлёва Е. А. РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ОРТОПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА	298
Зыбкина А. В., Щербаков Д. Н. СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ ПСЕВДОВИРУСОВ ЭБОЛА	300
Ибрагимова М. К., Кокорина Е. В., Цыганов М. М., Литвяков Н. В. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ АССОЦИАЦИИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ОНКОПАТОЛОГИЙ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ	302

- Ковалева К. С., Яровая О. И., Зайковская А. В., Щербаков Д. Н.,
Пьянков О. В., Зубков Ф. И., Салахутдинов Н. Ф.**
N-АЦИЛГИДРАЗОНЫ КАМФОРЫ И ФЕНХОНА В КАЧЕСТВЕ
ИНГИБИТОРОВ ВИРУСА НАНТААН ВЫЗЫВАЮЩЕГО ГЛПС.....306
- Коняхина Ю. В., Колосова И. В., Сергеев А. А., Щелкунов С. Н.**
ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КЛОНОВЫХ ВАРИАНТОВ ШТАММА
ЛИВП ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ309
- Лепехина Д. Ю., Харитонова Е. М., Лага В. Ю.** ПРОБЛЕМА
ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
ВИРУСОВ ПТИЦ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ.....312
- Матвеев А. Л., Матвеев Л. Е., Стронин О. В., Байков И. К.,
Емельянова Л. А., Ключевич Я. А., Тикунова Н. В.**
ХАРЕКТРИЗАЦИЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО
МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА *IN VIVO*315
- Мацшина Н. В., Собко О. А., Фисенко П. В., Ким И. В.**
ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
В АГРОБИОЦЕНОЗЕ КАРТОФЕЛЬНОГО ПОЛЯ317
- Налимова Т. М., Гашникова Н. М., Швалов А. Н., Тотменин А. В.,
Сандарева Т. П., Поздеева А. А.** УНИКАЛЬНЫЕ
РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ВИЧ-1, ОБНАРУЖЕННЫЕ
НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ319
- Нефедьева М. В., Титов И. А.** МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
МАКРОФАГОВ МУЛЬТИГЕННЫМ СЕМЕЙСТВОМ MGF110
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ322
- Никишов О. Н., Кузин А. А.** МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ
ПАРВОВИРУСНОЙ В19 ИНФЕКЦИИ.....324
- Осипова И. П., Селезнев А. А., Тотменин А. В., Швалов А. Н.,
Гашникова М. П., Гашникова Н. М.** ГЕНОТИПИРОВАНИЕ
ВАРИАНТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА,
ВЫДЕЛЕННЫХ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ327

Петрова П. А., Коновалова Н. И., Бояринцева А. Ю., Даниленко Д. М., Еропкин М. Ю. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А (H3N2), ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В 2019–2020 ГГ.....	330
Погожова М. П., Гайевская Н. Е., Аноприенко А. О. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>	332
Прокопенко П. И., Матюшенко В. А., Степанова Е. А., Котомина Т. С., Чистякова А. К., Крутикова Е. В., Циммерман Е. Л., Вонг П.-Ф. РАЗРАБОТКА ВЫСОКОИММУНОГЕННОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПУТЕМ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ <i>NS1</i> БЕЛКА	334
Прокопьева Е. А., Курская О. Г., Соломатина М. В., Соболев И. А. АДАПТИРОВАННЫЙ ВАРИАНТ ВИРУСА ГРИППА В ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>	336
Проценко М. А., Филиппова Е. И., Мазуркова Н. А., Лобанова И. Е., Высочина Г. И. РАСТЕНИЯ РОДА <i>MENTHA</i> , ОБЛАДАЮЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	338
Рында Е. Г., Гончаров А. Е., Антоневиц Н. Г., Тимохина О. В., Минич Я. С., Головач Е. А., Бобрукевич Д. В., Доценко М. Л., Доценко Э. А. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОИДНЫХ И МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19.....	340
Семенова А. В., Сиволобова Г. Ф., Гражданцева А. А., Пьянков О. В., Кочнева Г. В. ОПТИМИЗАЦИЯ ВАКЦИННОЙ КОНСТРУКЦИИ ПРОТИВ ЛИХОРАДКИ МАРБУРГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАССЕТЫ ГЕНОВ GP-VP40-NP	344
Сергеева М. В., Пудкина А. А., Романовская-Романко Е. А., Мустафаева А. С., Стукова М. А. ВИРУСЫ ГРИППА С ЛЮЦИФЕРАЗНЫМ РЕПОРТЕРОМ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ	346

- Степанова Е. А., Крутикова Е. В., Вонг П.-Ф., Чистякова А. К.**
ХИМЕРНЫЙ РЕАССОРТАНТ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ
ГРИППА А И В ИНДУЦИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ
К ВИРУСАМ ГРИППА ОБОИХ ПОДТИПОВ348
- Стрельцова Я. Б.** ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ГЕНЕТИКИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЦИРКОВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ350
- Тюфяков В. С., Сюткина А. С., Окулова И. И.** ОЦЕНКА
ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА
ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ЩЕНКОВ ЕНОТОВИДНОЙ СОБАКИ
ПРОТИВ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ПРОБИОТИКА СУБАЛИН 353
- Хорошавин Ю. А.** ОПРЕДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ
ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
СЕМИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ АЛЬФАВИРУСОВ.....356
- Цыденова И. А., Ибрагимова М. К., Цыганов М. М., Долгашева Д. С.,
Черемшина О. В., Литвяков Н. В.** ВПЧ-ПОЗИТИВНЫЙ РАК
ГОРТАНИ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОГНОЗОМ
ЗАБОЛЕВАНИЯ.....359
- Шамсутдинова О. А., Лаврентьева И. Н., Карал-оглы Д. Д.**
ПЦР-РВ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ
ПРИ ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КРАСНУХИ
В ОПЫТЕ НА ОБЕЗЬЯНАХ МАКАКА-РЕЗУС362
- Якубицкий С. Н., Бауэр Т. В., Сергеев А. А., Кабанов А. С.,
Пьянков С. А., Щелкунов С. Н.** УВЕЛИЧЕНИЕ
ИММУНОГЕННОСТИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ365

РАЗДЕЛ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

- Абикеева Т. А., Иванов М. К., Дзюбенко В. В.**
ВЫЯВЛЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА
ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА ДЛЯ РАННЕЙ

ДИАГНОСТИКИ ТЯЖЕЛЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ	367
Антоненко А. К. ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ <i>OTX2</i> И <i>CRX</i> В ПЕРИОД ПОСТНАТАЛЬНОГО СОЗРЕВАНИЯ СЕТЧАТКИ У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС <i>OXYS</i> ...	370
Арнаудова К. Ш., Астафьева О. В., Жаркова З. В. СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ.....	372
Архипова В. И., Кнауэр Н. Ю., Пашкина Е. А., Боева О. С., Веньяминова А. Г., Санчес-Ньевес Х., де ла Мата Ф. Х., Гомес Р., Апарцин Е. К. ТРИАЗИН-КАРБОСИЛАНОВЫЕ ДЕНДРИМЕРОСОМЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ	374
Арюков А. Р., Ракин А. И. НАЛИЧИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МАРКЕРАМИ ДОМЕНА <i>DBL1A</i> И <i>DBLV</i> ГЛАВНОГО ФАКТОРА ВИРУЛЕНТНОСТИ <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> (PFEMP1) В СЛУЧАЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ ТРОПИЧЕСКОЙ МАЛЯРИИ.....	376
Афонникова С. Д. ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ <i>HP1</i> С АУКСИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДАЦИЕЙ КОНДЕНСИНОВ И КОГЕЗИНА.....	379
Балькова А. Н., Ерошенко Г. А. ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И SNP-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>YERSINIA PESTIS</i> ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВЕТВИ 2.MED4 СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА	381
Басова Е. Ю., Литвинова Н. А., Саввина О. А., Шукуров Р. Р. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА <i>GNR-084</i> МЕТОДОМ ИММУНО-ПЦР	384
Бах С. Н., Щетникова Е. А. ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ПРОЦЕДУРЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ПОКАЗАТЕЛИ ДНК-КОМЕТ.....	390
Беленькая С. В., Шаньшин Д. В., Щербаков Д. Н., Яровая О. И., Вацадзе С. З. РАЗРАБОТКА ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ 3CL SARS-COV-2	392

- Богданова А. А., Немова Н. Н., Волкова Т. О.** ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ394
- Болдинова Е. О., Годке П. П. Г., Макарова А. В., Прадеепкumar П. И.,
Мирославская Н. А.** ТРАНСЛЕЗИОННАЯ АКТИВНОСТЬ
PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА НА ДНК-МАТРИЦАХ
С N2-АДДУКТАМИ ГУАНИНА397
- Буренина О. Ю., Лазаревич Н. Л., Зацепин Т. С., Рубцова М. П.,
Донцова О. А.** НОВАЯ ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ
РНК — ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР РАКА ПЕЧЕНИ
И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 399
- Вавилова В., Базарова Е., Бирюков М., Устьянцев К., Березиков Е.**
ГЕН MLIG-SKP1 НЕОБХОДИМ ДЛЯ ПРАВИЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ У РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО
СВОБОДНОЖИВУЩЕГО ЧЕРВЯ *MACROSTOMUM LIGNANO* 401
- Волкова Н. В., Исаева А. А., Таранов О. С., Казачинская Е. И.,
Щербаков Д. Н.** РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ
СБОРКУ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ВИРУСА МАРБУРГ403
- Галдина В. А., Блинова Е. А.** ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ TIM-3 И PD-1
НА ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ
Т-КЛЕТОК *IN VITRO* В НОРМЕ И ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ ..405
- Гамбург Т. А., Гончарова Е. П., Марков О. В., Зенкова М. А.** ОЦЕНКА
ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ
МЕЛАНОМЫ В-16 НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК
И ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ408
- Гаптулбарова К. А., Цыганов М. М., Родионов Е. О., Ибрагимова М. К.,
Долгашева Д. С., Литвяков Н. В.** ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ
ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНОВ *ERCC1, RRM1, TOP1,
TOP2A, TUBB3, TYMS, GSTR1* И *BRCA1* У ПАЦИЕНТОВ
С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО411
- Глинских А. В., Снытникова О. А., Разумов И. А., Коптюг И. В.,
Центалович Ю. П., Акулов А. Е.** МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ
ТКАНЕЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

МЕТОДОМ ЯМР В ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ МЫШЕЙ ЛИНИИ SCID	414
Голубев Д. А., Яковлева Д. В., Коваль Л. А., Москалёв А. А. РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ЦИКЛА КРЕБСА В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ DROSOPHILA MELANOGASTER К ДЕЙСТВИЮ СТРЕСС-ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ (СТРЕССУ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ, ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ, ТЕПЛОВОМУ ШОКУ)	416
Гордеева А. А., Подлесных С. В., Шаповал А. И. ПЕПТИДЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С МОЛЕКУЛОЙ АНТИГЕНА-4 ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ (CTLA-4)	418
Давлетова К.И., Бернадо А.В., Студеникина А.А. ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОТЕИНОВ И ЦИТОКИНОВ С ВЛИЯНИЕМ HUMAN LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR НА КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	420
Держалова А. С., Марков О. В., Фокина А. А., Шиохама Я., Зацепин Т. С., Фуджи М., Зенкова М. А., Стеценко Д. А. НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИЕ ЛИПОФИЛЬНЫЕ N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫЕ ГРУППЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА	422
Добронос М. А., Чепурных Т. В., Случанко Н. Н., Гороховатский А. Ю., Ямпольский И. В. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗ САЛЬПЫ <i>THALIA DEMOCRATICA</i>	425
Долгашева Д. С., Ибрагимова М. К., Цыганов М. М. АНАЛИЗ АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНА <i>PAP1</i> В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	427
Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Паталяк С.В., Вторышин С.В., Стонимская Е. М., Чердынцева Н. В. TGF- β 1 И ЕГО МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ: СВЯЗЬ С ОСОБЕННОСТЯМИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ЭСТРОГЕН-ПОЗИТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	430
Дубовиченко М. В., Колпащиков Д. М. БИВАЛЕНТНЫЕ ДНК- УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНЫХ РНК ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА	433

- Дьяконова А. Т., Курганов Х. А., Павлова Н. И., Борисова У. П.**
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ
ПАТОЛОГИЙ ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ
2-ГО ТИПА В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ).....436
- Дюдеева Е. С.** РАЗРАБОТКА ПОДХОДА
К ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОЙ ДЕПЛЕЦИИ РНК-МИШЕНЕЙ
С ПОМОЩЬЮ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ЗОНДОВ
И РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.....441
- Ермаков М. С., Коваль О. А., Нушгаева А. А.**
ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА СВОЙСТВА
ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ443
- Ермаков Е. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А.**
ГИСТОН-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА
ПРИ ШИЗОФРЕНИИ: ВЗАИМОСВЯЗЬ ВОСПАЛЕНИЯ
И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА445
- Замалутдинов А. В., Ломов Н. А., Зеркаленкова Е. А., Рубцов М. А.**
LOLA — БЫСТРЫЙ И ПРОСТОЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ
ОНКОГЕННЫХ ПЕРЕСТРОЕК T(4;11)(Q21;Q23)447
- Иванова И. А., Ершова М. О., Плешакова Т. О., Иванов Ю. Д.**
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА МЕТОДОМ АСМ
В РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ СКАНИРОВАНИЯ 450
- Ильина А.А., Саломатина О.В., Салахутдинов Н.Ф., Зенкова М.А.,
Марков А. В.** НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ЦИАНО-ЕНОН-
СОДЕРЖАЩИХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ: ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ГЛИО-
И НЕЙРОБЛАСТОМ453
- Ильющенко Д.В., Гунбин К.В., Попадьян К.Ю.** ЭВОЛЮЦИЯ МТДНК
МЛЕКОПИТАЮЩИХ:
МЫШИ ХОДЯТ МНОГИМИ МАЛЕНЬКИМИ ШАГАМИ,
СЛОНЫ — РЕДКИМИ БОЛЬШИМИ457
- Искра Е.Д.** УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ОККЛЮДИНА, КЛАУДИНА
И Е-КАДГЕРИНА В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ
АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА459

- Калюжная Я. Г., Бондаренко К. А., Болдинова Е. О., Макарова А. В.
ДНК-АПТАМЕРЫ KPRIMPOL ЧЕЛОВЕКА461
- Карпова Н. С., Дмитренко О. П., Нурбеков М. К., Абрамова О. И.,
Мошетова Л. К., Туркина К. И. АССОЦИАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА SIRT1RS12778366 С ВОЗРАСТНОЙ
МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ.....462
- Кипень В. Н., Снытков Е. В., Кривенко А. А., Патрин М. М. АНАЛИЗ
ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА MC1R ДЛЯ ОСОБЕЙ ВИДА
SUS SCROFA С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP465
- Кипень В. Н., Снытков Е. В., Кривенко А. А., Патрин М. М.
IN SILICO АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА H3GA0051811 ГЕНА NERH
ДЛЯ ЖИВОТНЫХ ВИДА SUS SCROFA469
- Кондратьев А. В., Костарной А. В., Ганчева П. Г., Соколова М. В.,
Метальников П. В. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПИДА А
И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА RICKETTSIA SIBIRICA473
- Корунова Е. С., Гороховатский А. Ю., Чепурных Т. В., Зиганшин Р. Х.,
Царькова А. С., Мокрушина Ю. А., Ямпольский И. В. СИНИЙ
ХРОМОБЕЛОК ИЗ МЕДУЗЫ RHIZOSTOMA PULMO: ОЧИСТКА,
СВОЙСТВА И ПОДБОР УСЛОВИЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ.....475
- Кочеткова А. С., Ильина Е. С., Ходырева С. Н., Лаврик О. И. ВЛИЯНИЕ
УРОВНЯ RARP1 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСЦИЗИОННОЙ
РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА477
- Кудояров Е. Р., Каримов Д. Д., Каримов Д. О., Хуснутдинова Н. Ю.,
Байгильдин С. С., Фазлыева А. С. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХЛОРИДА
КАДМИЯ НА ФРАГМЕНТАЦИЮ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫС479
- Кулаева Е. Д., Липилкин П. В. ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
И ОЦЕНКИ ПРОГНОЗА ПРИ МДС НА ОСНОВЕ СОМАТИЧЕСКИХ
МУТАЦИЙ В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРАХ481
- Кулешова А. Е., Пурвиньш Л. В., Буркова Е. Е. ОЦЕНКА УРОВНЯ
РАЗЛИЧНЫХ МИКРОРНК НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ
ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ МОЛОКА.....483

- Логвина Н. А., Хабардина Е. А., Стеценко Д. А., Зацепин Т. С.**
ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ CRISPR РНК
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО
РЕДАКТИРОВАНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СОЧЕТАНИИ
С БЕЛКАМИ CAS9 ПОВЫШЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ485
- Луцкая Е. А., Певзнер А. М., Долгашева Д. С., Ибрагимова М. К.,
Цыганов М. М.** АНАЛИЗ КОДИРУЮЩИХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНА
BRCA1 В ОПУХОЛИМОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 487
- Мадьярова Е. В., Дроздова П. Б., Димова М. Д., Гурков А. Н.,
Верещагина К. П., Адельшин Р. В., Тимофеев М. А.**
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСПОРИДИЙ
ГОЛАРКТИЧЕСКОГО ВИДА АМФИПОД *GAMMARUS*
LACUSTRIS ИЗ ВОДОЕМОВ БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА489
- Макаров Г. И., Шунялов А. В.** ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
МЕЖДУ СТОП-ПЕПТИДОМ SEC8M И РИБОСОМОЙ
E. COLI МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ.....491
- Макарова Т. М.** ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МОДИФИКАЦИИ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ A2503 НА РИБОСОМУ *E. COLI* МЕТОДАМИ
МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ493
- Максимова В. П., Усалка О. Г., Сагитова Г. Р., Пацюркевич А. А.,
Якубовская М. Г., Кирсанов К. И.** ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДА
ТИРАМА НА ГИСТОНОВЫЕ МОДИФИКАЦИИ495
- Матвеева А. М., Виноградов Д. И., Журавлёв Е. С., Степанов Г. А.**
РЕДАКТИРОВАНИЕ ИНТРОНОВ ГЕНА-ХОЗЯИНА
МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК GAS5 КАК ИНСТРУМЕНТ
ФУНКЦИОНАЛЬНОГО АНАЛИЗА 497
- Миннуллина Л. Ф., Шайдуллина Э. Р., Марданова А. М.**
АНАЛИЗ РЕЗИСТОМА УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ
MORGANELLA MORGANII, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ
ГОРОДА КАЗАНИ 499
- Монстакова Т. В., Азарнова Т. О., Кочипш И. И.** КОРРЕКЦИЯ
ИНТЕНСИВНОСТИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В УСЛОВИЯХ
ПРОМЫШЛЕННОЙ ИНКУБАЦИИ КУР ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ.....501

- Морозова Е. Е., Лактионов П. П., Сингх П.** ВЛИЯНИЕ LMNB1 НА РЕПЛИКАТИВНОЕ СТАРЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА...503
- Морячков Р.В., Заблуда В.Н., Кичкайло А.С., Спиридонова В.А., Берлина А. Н., Соколов А. Е.** ДНК-АПТАМЕРЫ В РАСТВОРЕ: ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА, КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ, СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ505
- Москалюк В.С., Кожемякина Р.В., Базовкина Д.В., Науменко В.С., Куликова Е.А.** ВЛИЯНИЯ ОСТРОГО ВВЕДЕНИЯ ТС-2153 НА ЭКСПРЕССИЮ СЕРТОНИНОВЫХ 5-HT1A И 5-HT7 РЕЦЕПТОРОВ И ТРАНСКРИПТОВ BDNF У РУЧНЫХ И АГРЕССИВНЫХ КРЫС507
- Мутин А. Д., Верещагина К.П., Л. Якоб, Бедулина Д.С., М. Лукасен, Тимофеев М. А.** ВЛИЯНИЕ ПОСТЕПЕННОГО ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ И ГОЛАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД509
- Никитин М. С., Ковтун А. С., Даниленко В. Н., Захаревич Н. В., Артамонова И. И.** CRISPR-CAS СИСТЕМЫ В МИКРОБИОМЕ КИШЕЧНИКА БОЛЬНЫХ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ511
- Одаренко К. В., Сенькова А. В., Саломатина О. В., Салахутдинов Н. Ф., Зенкова М. А., Марков А. В.** ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ЦИАНО-ЕНОН-СОДЕРЖАЩИЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНГИБИТОРЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕХЕНХИМАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК514
- Панферов Е.В., Ныров В.А., Слизов П.А., Глушаков Р.И., Спивак И. М.** КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ В ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОЙ МОРФОМЕТРИИ...517
- Парамоник А.П., Куцейкин С.С., Осипов И.Д., Нетесов С.В.** НОВЫЙ ХИМЕРНЫЙ АДЕНОВИРУС ЭФФЕКТИВЕН ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ КОКСАКИ-АДЕНОВИРУСНОГО РЕЦЕПТОРА521

- Переверзев И. М., Торгашева Н. А., Голосова О. И., Тиунов А. В., Шеведев Г. Ю.** СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ОБЗОР ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРОГРАММ СИНТЕЗА ГЕНОВ И КЛЮЧЕВЫХ ПАРАМЕТРОВ, ИСПОЛЗУЕМЫХ ПРИ ОПТИМИЗАЦИИ ИХ СТРУКТУРЫ 524
- Плотников К. О., Рябинина В. А., Блажко Н. В., Пашковский С. Е.** ВЗАИМОСВЯЗЬ ТИПОВ ФАЗЕОЛИНА С КОЛИЧЕСТВЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ 527
- Полякова А. А., Медведев Д. С.** ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ДЛЯ РАННЕЙ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИЖИВАЕМОСТИ ИМПЛАНТОВ У ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА 530
- Резвых А. М., Азарнова Т. О., Максимов В. И., Луговая И. С.** КОРЕКЦИЯ АЦИДОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ У ЭМБРИОНОВ ИНДЕЕК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ 532
- Родионова М. Д., Варламова Е. А., Брутер А. В.** ВОЗМОЖНОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОТЕИНКИНАЗЫ CDK8 ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ: СРАВНЕНИЕ С ЦИТАРАБИНОМ 534
- Родный А. Я., Барабошкина И. А., Ильчибаева Т. В., Антонов Е. В., Куликова Е. А., Базовкина Д. В., Науменко В. С.** ЭФФЕКТ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *HTR7* В СРЕДНЕМ МОЗГЕ НА ПЛАСТИЧНОСТЬ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА У МЫШЕЙ ЛИНИИ ASC — ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ДЕПРЕССИИ 536
- Родный А. Я., Ерёмин Д. В., Ильчибаева Т. В., Науменко В. С., Кондаурова Е. М.** ЭФФЕКТ НОКАУТА ГЕНА *CC2D1A*, КОДИРУЮЩЕГО ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР FREUD-1, В ГИППОКАМПЕ НА НЕЙРОТРОФИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ 538
- Рудомётов А. П., Рудомётова Н. Б., Щербаков Д. Н., Ильичёв А. А., Карпенко Л. И.** ХИМЕРНЫЕ ИММУНОГЕНЫ, НЕСУЩИЕ ФРАГМЕНТЫ GP41 ВИЧ-1, СОДЕРЖАЩИЕ ЭПИТОПЫ VNAbs 540
- Рудомётова Н. Б., Щербакова Н. С., Щербаков Д. Н., Карпенко Л. И., Соколова А. С., Яровая О. И.** СКРИНИНГ ПАНЕЛИ СОЕДИНЕНИЙ

НА ОСНОВЕ МОНОТЕРПЕНОИДОВ НА СПОСОБНОСТЬ БЛОКИРОВАТЬ ПРОНИКНОВЕНИЕ ПСЕВДОВИРСУОВ ВИЧ-1 В КЛЕТКУ-МИШЕНЬ	542
Румянцев А. В., Тишакова К. В. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОМОСОМСПЕЦИФИЧНЫХ ЗОНДОВ ЙЕМЕНСКОГО ХАМЕЛЕОНА (<i>CHAMAELÉO CALYPTRATUS</i>)	544
Садовская Т. А., Иванов Ю. Д., Смирнова Е. Ю. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОНКОМАРКЕРА NFATC1 МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ.....	546
Саранчина А. Е., Бедулина Д. С. ПРОТЕОМНЫЙ СТРЕСС-ОТВЕТ РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЕЙ ТЕЛА ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД <i>EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS</i> НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ....	549
Сергеева О. В., Ялчина Р. С., Приказчикова Т. А., Абакумова Т. О., Курочкин И. И., Зацепин Т. С. DDX3 РНК ХЕЛИКАЗА В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ МИРНК-ОПОСРЕДОВАННОМ ПОДАВЛЕНИИ ЭКСПРЕССИИ DDX3 <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>	551
Снытков Е. В., Кипень В. Н. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ <i>AS3MT</i> , <i>PESR</i> И <i>MUC7</i> В УВЕЛИЧЕНИИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ	553
Снытков Е. В., Кипень В. Н. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ <i>EPHX2</i> , <i>MUC7</i> И <i>DGK1</i> В УВЕЛИЧЕНИИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ	556
Сорокина Ю. В., Рыболовлев И. Н., Тартаковская Д. И., Белый Ю. Ф. <i>АТФАЗЫ CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i>	559
Субботина К. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ САРКОМЫ ЮИНГА	561
Суворова Ю. В., Петухова Е. А. ПОДХОДЫ ХЕМО- И БИОИНФОРМАТИКИ ДЛЯ ВИРТУАЛЬНОГО СКРИНИНГА	

- ПРАКТИЧЕСКИ ВАЖНЫХ СВОЙСТВ ДВУХЪЯДЕРНЫХ
БИСТИАЗОЛ- И БИСТИАДИАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ АМИНОВ563
- Суховских А. В., Молодых О. П., Ушаков В. С., Политко М. О.,
Соколов Д. К., Колдышева Е. В., Григорьева Е. В. ВЛИЯНИЕ
ДЛИТЕЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СТАРЫХ КРЫС566
- Тимонина В. Н., Сокол А. Д., Кнорре Д. А., Третьяков Е. О.,
Гунбин К. В., Попадьян К. Ю. HSP90 КАК ДОЛГОСРОЧНЫЙ
БУФЕР МУТАЦИОННОГО ГРУЗА568
- Тананыкина Е. К., Пьячентини М., Барлев Н. А., Шувалов О. Ю.
СПЛАЙС-ИЗОФОРМЫ MDM2 В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ
РАКА ЛЕГКОГО И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА572
- Турубанова В. Д., Ефимова Ю. В., Балалаева И. В., Мищенко Т. А.,
Савюк М. О., Ведунова М. В., Крысько Д. В. ИММУНОГЕННЫЕ
ПУТИ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИНДУЦИРУЕМЫЕ
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ
НОВЫХ ФОТОАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОРФИРАЗИНОВ574
- Тюлин А. А., Тараскин А. С., Протасов А. В., Миргородская О. А.
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА MALDI-TOF
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ МУЛТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА
ФАКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
БЕЗ ЕЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ
С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ЕГО ВЕРЕФИКАЦИЕЙ577
- Устьянцев К. В., Вавилова В. Ю., Бирюков М. Ю., Рейноите Ф.,
Вударски Я., Мутон С., Березиков Е. В. РАЗРАБОТКА
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
МЕХАНИЗМОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛЬНОГО РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО
ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ *MACROSTOMUM LIGNANO* 580
- Фабушева К. М., Дворник Ю. В. УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК
В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ
ЛИНИИ AF В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ582
- Хабардина Е. А., Семиколенова О. А., Данилин Н. А.,
Махалова К. И. ФОТОАКТИВИРУЕМАЯ СИСТЕМА

CRISPR/CAS9 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЛОКИРУЮЩИХ ФОТОРАСЦЕПЛЯЕМЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	584
Чернышова И. А., Захаренко А. Л., Дреничев М., Михайлов С. Н., Лаврик О. И. ИНГИБИРОВАНИЕ ТИРОЗИЛ- ДНК ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПИРИМИДИНОВЫМИ НУКЛЕОЗИДАМИ	586
Чиглинцева Д. А., Патугина О. А., Хейман Т., Биченкова Е. В., Гапонова С. К., Власов В. В., Зенкова М. А. КРАБОПОДОБНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ПЕПТИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ОНКОГЕННЫХ МИКРОРНК.....	589
Шаманский В. А., Михайлова А. А., Ушакова К., Михайлова А. Г., Орешков С., Кнорре Д., Третьяков Е. О., Зажицкая М., Луковски С. В., Лиу Чиа-Вэй, Линь Цу-Кунг, Кунц В. С., Реймонд А., Мазунин И., Базыкин Г. А., Гунбин К., Фелле Ж., Танака М., Храпко К., Попадьян К. РИСК СОМАТИЧЕСКИХ ДЕЛЕЦИЙ МИТОХОНДРИЙ ЗАВИСИТ ОТ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА	591
Шаповалова А. И. ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА VEGF И VEGFR В БИОПТАТАХ ИНТАКТНОГО МИОМЕТРИЯ ПРИ МИОМЭКТОМИИ У ЖЕНЩИН РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП	594
Шарабрин С. В., Рудомётов А. П., Волосникова Е. А., Карпенко Л. И., Бажан С. И., Ильичёв А. А. ДОСТАВКА МРНК ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА С ПОМОЩЬЮ КАТИОННОГО ПОЛИСАХАРИДНОГО ПОЛИМЕРА	596
Щур В. В., Буренкова Ю. П., Жолнерович А. И., Усанов С. А., Янцевич А. В. ДВУЦЕПОЧЕЧНАЯ ДНК С 5'-ДМТ ЗАЩИТНЫМИ ГРУППАМИ: ПОЛУЧЕНИЕ И УЧАСТИЕ В ЛИГАЗНОЙ РЕАКЦИИ.....	599
Юрина А. А. СОЗДАНИЕ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К CD5 ЧЕЛОВЕКА.....	602

Научное издание

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

Сборник тезисов

Корректоры

Я. О. Козлова, Д. М. Валова

Верстка А. С. Терешкиной

Подписано в печать 20.10.2020 г.

Формат 60 × 84 1/16. Уч.-изд. л. 40. Усл. печ. л. 37,3.

Тираж 110 экз. Заказ № 200.

Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.

ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

Площадка открытых коммуникаций OpenBio – комплекс мероприятий, посвященных коммерциализации идей и развитию бизнеса в сфере наук о жизни:



ФОРУМ ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ



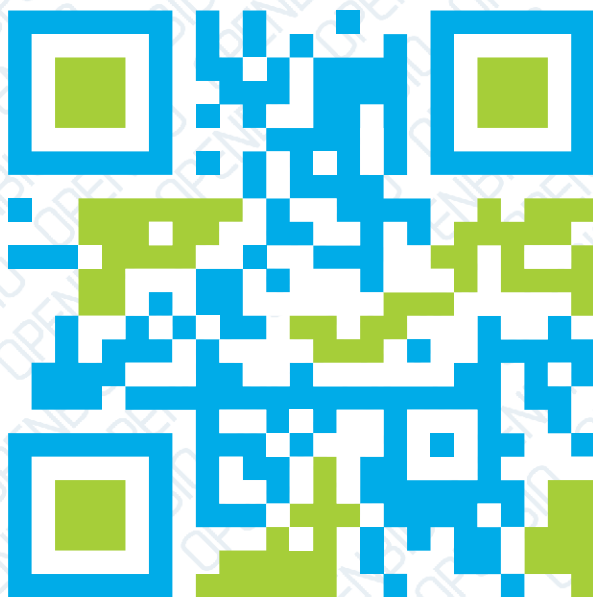
**НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ ВИРУСОЛОГОВ,
БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И БИОФИЗИКОВ**



**ВЫСТАВКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ**



**НАУКА БЕЗ ГРАНИЦ:
ДЕТСКИЙ ФОРУМ, ART SCIENCE, ЭСТЕТИКА МИКРОМИРА**



ISBN 978-5-4437-1114-0



9 785443 711140

www.openbio.ru