

OPEN  
BIO

# СБОРНИК ТЕЗИСОВ

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

**В РАМКАХ ПЛОЩАДКИ ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO**

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО, 2022



ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



ИННОВАЦИОННЫЙ  
ЦЕНТР КОЛЬЦОВО



НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО



БИОТЕХНОПАРК  
КОЛЬЦОВО



БИОФАРМ



ИНЖЕНЕРСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР КОЛЬЦОВО



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

Сборник тезисов

Новосибирск  
Наукоград Кольцово  
2022

УДК 577.2:62.01:578+(001)  
ББК 28.07:30.16:28.4  
М431

**М431** IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков — 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2022. — 764 с.

ISBN 978-5-4437-1362-5

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной научно-практической конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов и биофизиков, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2022.

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

УДК 577.2:62.01:578+(001)  
ББК 28.07:30.16:28.4

## РАЗДЕЛ 1

## БИОИНФОРМАТИКА

РЕКОНСТРУКЦИЯ И АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ  
ВНЕШНЕГО ПУТИ АПОПТОЗА ПРИ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

А. В. Адамовская

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск  
Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск  
Новосибирский государственный университет*

✉ a.adamovskaya@g.nsu.ru

**Аннотация**

Активация внешнего пути апоптоза во многом зависит от соотношения про- (Caspase-8) и антиапоптотических (CFLAR) белков. В данной работе были реконструированы и проанализированы молекулярно-генетические пути, описывающие регуляцию внешнего пути апоптоза белками вируса гепатита С, направленную на белки FADD, Caspase-8 и CFLAR.

Вирусный гепатит С — одно из наиболее распространенных и опасных инфекционных заболеваний во всем мире, вызываемое вирусом гепатита С (ВГС) и поражающее в первую очередь клетки печени. Инфекция может развиваться в организме годами, приобретая хронический характер, и почти никак не проявлять себя. Хронический гепатит С служит одной из основных причин цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [1].

Проникая в организм, ВГС стремится осуществлять контроль над биологическими процессами, протекающими в клетках хозяина, с целью повышения своей выживаемости и эффективности репликации. Одним из таких процессов является апоптоз, который играет важную роль в развитии и гомеостазе организма, уничтожении дефектных клеток. Понимание механизмов регуляции апоптоза белками ВГС может помочь в поиске новых мишеней для воздействия лекарств при гепатите С; в разработке фармакологических препаратов для борьбы с такими заболеваниями, как гепатоцеллюлярная карцинома, нейродегенеративные расстройства и др., при которых нарушается процесс программируемой клеточной гибели.

Реконструкция генных сетей проводилась в разработанной в ИЦиГ СО РАН системе ANDSystem [2], осуществляющей автоматическое извлечение информации о молекулярно-генетических взаимодействиях различного типа из текстов научных публикаций и баз данных.

В работе показано, что белки ВГС могут напрямую взаимодействовать с 33 белками внешнего пути апоптоза. С использованием средств ANDSystem в полногеномной генной сети человека были выявлены потенциальные регуляторные молекулярно-генетические пути, описывающие регуляцию внешнего пути апоптоза при вирусном гепатите С. Найдены молекулярно-генетические пути, включающие от одного до двух посредников между белками ВГС и тремя ключевыми белками апоптоза (FADD, CFLAR, Caspase-8). Среди белков-посредников оказались: p53, c-Jun, ATM, hnRNPК, Nucleolin, STAT3, SRC. Построена ассоциативная генная сеть, описывающая различные механизмы регуляции внешнего пути апоптоза вирусными белками. Анализ топологических свойств генной сети показал, что белки Caspase-8, FADD, RAC, TRAF2, SRC, GSK3 $\beta$  и ген BBC3 обладают наибольшими показателями центральности.

**Литература**

1. Rabaan A. A. et al. Overview of hepatitis C infection, molecular biology, and new treatment // J. Infect. Public Health. 2020. Vol. 13, № 5. P. 773–783.
2. Ivanisenko V. A. et al. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology // BMC Syst. Biol. 2015. Vol. 9, № 2.

## ПОИСК И АНАЛИЗ SNP В РЕЦЕПТОРЕ ЛЕПТИНА

Д. С. Аксенова

Волгоградский государственный университет

✉ bib-201\_114548@volsu.ru

### Аннотация

Исследование полиморфизмов лептинового рецептора может пролить свет на остеоартроз, связанный с ожирением. В данной статье описаны 15 SNP-рецепторов лептина, из которых 1 находится в некодируемой области, 11 — в интронной, а значит, удаляются в процессе сплайсинга, 3 — с миссенс-мутациями, способными повлиять на пространственную конфигурацию рецептора, а также на его главную функцию — связывание с белком.

Остеоартроз — самое распространенное заболевание суставов, характеризующееся разрушением суставного хряща. Одним из факторов риска возникновения остеоартроза является избыточная масса тела, которая может быть вызвана ожирением. Ключевую роль в регуляции гормона лептина, избыточная экспрессия которого напрямую связана с ожирением, выполняет лептиновый рецептор, экспрессирующийся на поверхности хондроцитов.

Лептиновый рецептор принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов, участвует в регуляции жирового обмена. Мутации в этом рецепторе были связаны с ожирением и дисфункцией гипоталамуса. Хондроциты экспрессируют длинную изоформу лептинового рецептора. Только длинная изоформа содержит внутриклеточный мотив, необходимый для активации пути передачи сигналов JAK-STAT (*Janus kinase — Signal transducers and activators of transcription*) [1]. Следовательно, возникающие в рецепторе мутации могут существенно изменить его структуру, что может повлиять на передачу сигналов между клетками.

Уже доказано, что лептин стимулирует синтез внеклеточного матрикса (коллаген и протеогликаны), что говорит о его непосредственном влиянии на формирование хряща. Также при взаимодействиях с другими провоспалительными цитокинами лептин способствует выработке оксида азота в хондроцитах, что приводит к гибели клеток [2]. Оксид азота ингибирует синтез макромолекул матрикса хряща и снижает экспрессию антагониста рецептора ИЛ-1 хондроцитами, участвует в синтезе простагландина E<sub>2</sub>, способствует апоптозу хондроцитов, снижает интенсивность анаболического процесса [3].

Целью работы стал анализ SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) в рецепторе лептина, который может повлиять на связывание рецептора с лептином в хондроцитах, что, в свою очередь, приводит к разрушению хрящевой ткани.

Поиск SNP-рецептора лептина проводился в базе данных свободного доступа PubMed, а также dbSNP NCBI. Найдено 15 различных полиморфизмов. Из них 11 кодируются в интроне: rs11804091, rs13306520, rs13306522, rs1359482195, rs1751492, rs2186248, rs2767485, rs4655555, rs70940803, rs79639154, rs9436303. Следовательно, на конечный белок это не оказывает влияния, так как они удаляются в процессе сплайсинга. Один из полиморфизмов — rs3790435 — находится в 5'UTR (нетранслируемая область). SNP с миссенс-мутациями:

1) **rs1137100 (K109R)** имеет позицию chr1:65570758 (GRCh38.p13), обуславливает замену лизина на аргинин (K [AAG] > R [AGG]) или, по данным dbSNP NCBI, на метионин (K [AAG] > M [ATG]). В целом лизин и аргинин относятся к одному классу основных аминокислот, что может и не привести к изменению пространственной конфигурации рецептора, а замена на неполярный метионин может значительно изменить белок;

2) **rs1137101 (Q223R)** обуславливает замену нейтральной глутаминовой аминокислоты на основной аргинин Q [CAG] > R [CGG]. Данная замена располагается в центре связывания рецептора с лептином, снижая его сродство к лептину. Также, по данным dbSNP NCBI, может произойти замена глутамин на неполярный лейцин Q [CAG] > L [CTG], что тоже может привести к изменениям в пространственной структуре рецептора;

3) **rs1805094 (Lys656Asn)** производит замену основного лизина на нейтральный аспарагин K [AAG] > N [AAC], или K [AAG] > N [AAT].

### Литература

1. Коваренко М. А., Рутякина Л. А., Петрищева М. С. и др. Лептин: физиологические и патологические аспекты действия // Вестн. НГУ. Сер.: Биология, клиническая медицина. 2003. Т. 1, вып. 1. С. 59–74.
2. Otero M., Lago R., Lago F. et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights // FEBS Lett. 2005, Jan. 17. Vol. 579 (2). P. 295–301.
3. Бадокин В. В. Артрофоон — модификатор симптоматики, клинического течения и прогноза остеоартрита // Consilium Medicum. 2015. Т. 17 (9). С. 130–134.

## ВЛИЯНИЕ TNF НА ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ K562 С НОКАУТОМ РЕЦЕПТОРА 2-ГО ТИПА К TNF\*

С. Алрхмун<sup>1,2</sup>, А. А. Альшевская<sup>1</sup>, Ю. В. Жукова<sup>1</sup>, Ю. А. Лопатникова<sup>1</sup>,  
Р. Ю. Перик-Заводский<sup>1</sup>, Д. В. Юдкин<sup>2</sup>, А. К. Матвеева<sup>2</sup>, С. В. Сенников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

✉ saleh.alrhoun1@gmail.com

### Аннотация

Фактор некроза опухоли-альфа (TNF) — плейотропный цитокин, передающий сигнал через два специфических рецептора TNFR1 и TNFR2, которые, как полагают, имеют разные сигнальные пути. Цель данного исследования — оценка транскриптома клеточной линии человека K562 с нокаутом рецептора TNF 2-го типа и анализ изменений в профиле экспрессии генов при активации клеток с помощью TNF.

При связывании TNF с одним из его рецепторов могут запускаться реакции пролиферации и выживаемости клетки, а также апоптоза. Остается неизученным вопрос о влиянии экспрессии рецепторов разных типов на функциональную активность клеток, пороговом уровне ответа клеток при связывании рецепторов TNF с цитокином и возможностях переключения между различными сигнальными путями. На клеточной линии человека K562 (хроническая миелогенная лейкемия) был получен нокаут рецептора TNF 2-го типа. С помощью метода проточной цитометрии подтверждена эффективность и стабильность данного генетического нокаута и показано отсутствие TNFR2 на мембранах клеток при последующих пассажах. Показано, что нокаут одного рецептора TNF приводит к компенсаторному повышению экспрессии рецептора 1-го типа. Для оценки влияния связывания TNF только с 1-м типом рецептора клеточные линии культивировали в течение 72 ч в присутствии рекомбинантного TNF в концентрации 5 нг/мл. Далее тотальную РНК выделяли из 250 тыс. клеток образцов и проводили профилирование экспрессии генов на основе системы анализа Nanostring nCounter SPRINT Profiler с помощью панели nCounter Human Immunology v2, состоящей из 579 иммунных и ассоциированных с воспалением генов, включая 15 генов домашнего хозяйства. После гибридизации зондов с интересующими мишенями в образцах число молекул-мишеней количественно определяли с использованием цифрового анализатора nCounter и оценивали с помощью платформы nSolver.

### Результаты

Анализ дифференциальной экспрессии генов на линии K562 с нокаутом TNFR2 показал статистически значимое увеличение экспрессии 42 генов, а также снижение экспрессии 8 генов, но значимыми считались только гены с кратным изменением выше 2 и ниже -2, в результате чего получилось 25 генов с повышенной экспрессией и 3 гена со сниженной (см. рисунок). Два гена с повышенной экспрессией не показаны на графике (CL2 и CFP), поскольку они не экспрессировались в клетках без TNF, следовательно, невозможно рассчитать кратность изменения для них.

Анализ обогащения онтологии генов PANTHER позволяет предположить, что основная часть генов с повышенной экспрессией относится к регуляции активности адаптивного и врожденного иммунитета (активация комплемента; активация и дегрануляция нейтрофилов; пролиферация и активация лимфоцитов; выработка цитокинов и передача сигналов, опосредованных ими; иммуноглобулин-опосредованный иммунный ответ и опосредованная лейкоцитами цитотоксичность) в дополнение к миграции и хемотаксису различных типов иммунных клеток. Кроме того, эти гены были связаны с обработкой и презентацией эндогенных и экзогенных антигенов, а также с запрограммированной гибелью клеток. Следовательно, подтверждается идея, что TNFR1 опосредует TNF-индуцированное воспаление и гибель клеток, но также, как показывают наши данные, может играть роль в активации, миграции и пролиферации клеток, функциях, которые обычно связаны с TNFR2. С другой стороны, группа генов, у которых была пониженная экспрессия, не показала каких-либо статистически значимых результатов, главным образом из-за небольшого количества генов.

\* Исследование выполнено в рамках темы госзадания (номер регистрации в ЕГИСУ НИОКТР 122011800353-4).

© С. Алрхмун, А. А. Альшевская, Ю. В. Жукова, Ю. А. Лопатникова, Р. Ю. Перик-Заводский, Д. В. Юдкин, А. К. Матвеева, С. В. Сенников, 2022

Таким образом, при анализе экспрессии генов с помощью системы Nanostring nCounter Sprint были показаны значительные изменения в экспрессии генов при взаимодействии TNF с 1-м типом рецептора, что подтверждает эффективность данного подхода для исследования транскриптома на клетках с разным уровнем экспрессии специфических рецепторов.

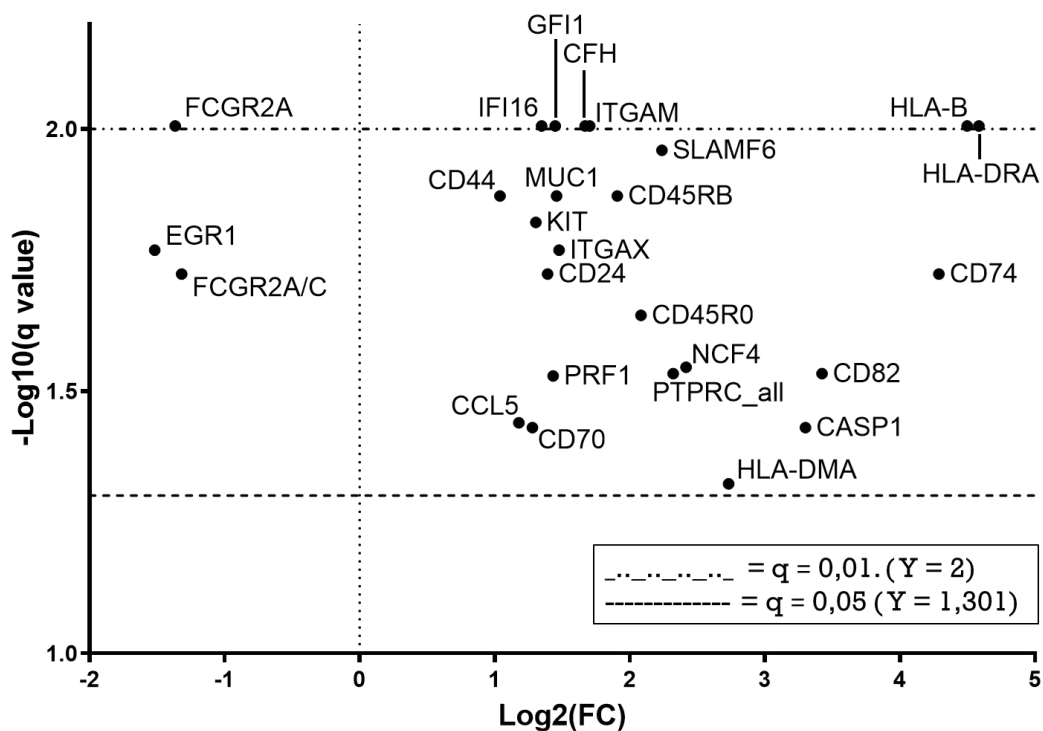


График вулкана, сравнивающий экспрессию генов в клетках K562 с нокаутом TNFR2 с концентрацией TNF 5 нг/мл и в клетках без TNF. FC — кратность изменения; отношение средних значений групп, q value; p value, скорректированное FDR



## ЛЕКАРСТВЕННАЯ ПАНЕЛЬ ЛИГАНДОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БАЗЫ ДАННЫХ DRUGBANK, СПОСОБНЫХ МОДУЛИРОВАТЬ ЕГО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С АМИЛОИДНЫМ В-ПЕПТИДОМ\*

Л. А. Боброва, Е. И. Дерюшева, Е. А. Литус

*Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН —  
обособленное подразделение Пуцунского научного центра биологических исследований РАН*

✉ bobrovalola@gmail.com

### Аннотация

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) — природный буфер амилоидного  $\beta$ -пептида (А $\beta$ ), ключевого фактора развития болезни Альцгеймера (БА). Перспективным подходом к профилактике БА является снижение концентрации свободного А $\beta$  путем направленной стимуляции взаимодействия ЧСА с А $\beta$  за счет влияния лигандов ЧСА на процесс комплексообразования. Мы доказали, что увеличение сродства ЧСА к А $\beta$  возможно с помощью таких низкомолекулярных лигандов ЧСА, как линолевая и арахидоновые кислоты, ибупрофен, серотонин. При этом серотонин обладает наиболее выраженным эффектом по сравнению с другими исследованными лигандами. Так, в присутствии 1 мМ серотонина константа диссоциации комплекса ЧСА-А $\beta$  снижалась в 7–17 раз. Анализ комплекса «ЧСА — серотонин», полученного методом молекулярного докинга, позволил выявить наиболее вероятный сайт связывания серотонина. Эти данные могут быть использованы для объяснения механизмов изменения сродства ЧСА-А $\beta$  под влиянием других низкомолекулярных лигандов ЧСА.

Цель данной работы — поиск новых лекарственных низкомолекулярных лигандов ЧСА, способных модулировать (усиливать/уменьшать) его взаимодействие с А $\beta$  на основе найденного паттерна комплекса «ЧСА — серотонин». Для систематического поиска низкомолекулярных лигандов ЧСА проанализирована база данных DrugBank. В качестве критериев отбора кандидатов использовали величины их растворимости в воде, концентрации в плазме крови и проницаемости через гематоэнцефалический барьер, а также ассоциацию с БА. Анализ соответствующих литературных источников (поиск взаимосвязи с БА) был проведен на основе данных онлайн-ресурса *Alzforum* (<https://www.alzforum.org/>), который является исследовательским проектом по управлению научными знаниями, информацией и данными о БА. Для оценки специфичности сайтов связывания исследуемых лигандов смоделированы их трехмерные комплексы с ЧСА. Трехмерная структура ЧСА получена из *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Для моделирования комплексов «ЧСА — лиганд» использовалась программа *AutoDock Vina* (<https://vina.scripps.edu/>). Алгоритмы поиска и анализа данных реализованы с помощью высокоуровневого языка программирования Python. Полученные сайты взаимодействия были сравнены с найденным ранее паттерном взаимодействия «ЧСА — серотонин». В результате были отобраны 16 лекарственных низкомолекулярных лигандов ЧСА (атомоксетин, каптоприл, клонидин, диклофенак, глибенкламид, изофлуорофат, кетопрофен, ламотриджин, летрозол, оксипутинин, фенитоин, пропранолол, пиридостигмин, тиамин, толбутамид и толметин), являющихся наиболее перспективными для дальнейших исследований.

В случае последующего экспериментального подтверждения способности данных лигандов модулировать процесс образования комплекса ЧСА с А $\beta$  некоторые из них могут стать основой для разработки препаратов для профилактики и лечения БА.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-74-10072 (Е. А. Литус).  
© Л. А. Боброва, Е. И. Дерюшева, Е. А. Литус, 2022

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СТРУКТУР КОМПЛЕКСОВ ACE2 И RBD S-БЕЛКА КОРОНАВИРУСОВ И ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ НА АФФИННОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ

Е. А. Богданова, Д. И. Тычинин, В. Н. Новоселецкий

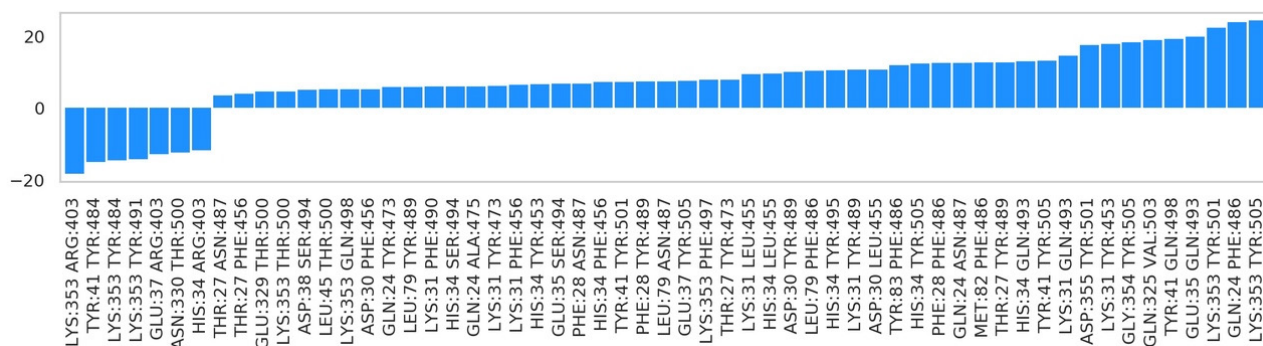
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

✉ elizawea@yandex.ru

### Аннотация

В работе проведена оценка ряда экспериментально полученных структур комплексов ACE2 и RBD коронавирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2, включая многочисленные мутантные формы последнего. С помощью статистических тестов определены экспонированные группы атомов, влияющие на аффинность комплекса, а также основные взаимодействующие аминокислотные пары.

Заражение клеток человека вирусами SARS-CoV-2 происходит посредством взаимодействия домена RBD S-белка с рецептором ACE2. Расширенные структуры комплексов ACE2-RBD позволяют провести анализ межмолекулярных взаимодействий между этими белками. Отобраны 30 структур с известной константой диссоциации (Кд). Для статистической оценки комплексы разделили на два класса: низкоаффинные ( $K_d > 30$  нМ,  $n = 11$ ) и высокоаффинные ( $K_d < 30$  нМ,  $n = 19$ ). На интерфейсе ACE2-RBD выявлены экспонированные тяжелые атомы, каждый из которых отнесен к одному из 15 типов, аналогичных типам в силовом поле CHARMM. Рассматриваемые атомы объединены в пары «атом из ACE2 — атом из RBD», рассчитаны расстояния в таких парах и принадлежность к одному из четырех интервалов: 2–4; 4–5; 5–6; 6–10 Å. Таким образом, был получен набор из 480 признаков вида «атом типа 1 — атом типа 2 — интервал», причем цепи RBD и ACE2 мы полагали равноправными. Для выявления связи выраженности этих признаков (т. е. число пар атомов конкретных типов в конкретном интервале расстояний) с принадлежностью комплекса к классу высоко- или низкоаффинных был использован U-критерий Манна — Уитни. Такой подход позволил выявить 34 статистически значимых ( $p$ -value  $< 0,05$ ) признака из 480, причем большая их часть влияет на связывание положительно (т. е. чем более высокую аффинность мы видим у комплексов, тем сильнее выражен у них этот признак), в то время как остальные признаки влияют отрицательно. Среди положительно влияющих можно отметить расположение ароматических атомов углерода в интервалах 2–4 и 4–5 Å, что соответствует стэкинг-взаимодействию остатков Y83 (ACE2) и F486 (RBD), а также многочисленные пары ароматических и алифатических атомов углерода в этих же интервалах, реализующих гидрофобные контакты. К отрицательно влияющим на связывание были отнесены, например, пары алифатических атомов углерода в интервале 5–6 Å. Можно предположить, что наличие таких пар говорит о нереализованности потенциальных гидрофобных контактов и, напротив, о возможном наличии молекулы воды между двумя гидрофобными атомами. Несмотря на значительное число полярных атомов на интерфейсе, не было выявлено признаков, которые можно было бы интерпретировать как образование Н-связи непосредственно между остатками. Это означает, что высоко- и низкоаффинные комплексы не отличаются друг от друга по числу Н-связей между



Разница частоты встречаемости значимых аминокислотных остатков с нормировкой на размер выборки применительно к группам низко- и высокоаффинных комплексов. В отрицательных значениях — пары аминокислотных остатков, характерные для низкоаффинных комплексов, в значениях больше 10 — для высокоаффинных комплексов, центральная группа от 0 до 10 — контакты, характерные для двух групп

---

атомами белка. Между тем выявлено несколько признаков, которые могут быть интерпретированы как образование связи между остатками посредством одной молекулы воды или более. Например, таковой является связь между остатками G354 (ACE2) и V503 (RBD), опосредованная двумя молекулами воды (наблюдается в структуре 6lzg и ряде других из PDB). Для всех значимых признаков возможно определение конкретных аминокислотных остатков, атомы которых входят в тот или иной признак. На рисунке приведены наиболее характерные пары аминокислотных остатков и разница частот их встречаемости. Видно, что в зависимости от пары K353 (ACE2) кардинально может измениться аффинность комплекса. Варианты Y505 и Y501 (RBD) характерны для группы комплексов высокой аффинности, а варианты R403, Y484, Y491 (RBD) — для низкой.

Полученные результаты открывают перспективу использования данных о межатомных расстояниях для оценки комплексов Кд. Кроме того, большое число статистически значимых признаков, относящихся к неполярным атомам, свидетельствует о важности гидрофобных контактов в образовании комплексов между RBD и ACE2.

## HETEROGENEITY OF STROMAL CELL POPULATIONS IN TUMOR MICROENVIRONMENT AT THE LEVEL OF RNA EXPRESSION

S. S. Bratchikov<sup>1</sup>, A. V. Bagaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University*

<sup>2</sup> *BostonGene corp., Moscow*

✉ bratchikov.ss@physics.msu.ru

### Abstract

This study presents characterisation of identified three major types of cancer associated fibroblasts. Machine learning models (lightGBM) were used to show structural difference of these types between patients with different stages of pancreatic cancer.

Tumor microenvironment (TME) was shown [1] to form key aspects necessary for tumor development and expansion. Tumor microenvironment consists of numerous cell types including [2] T-cells, Natural Killer cells, Tumor associated macrophages, Myeloid derived suppressor cells, Mast cells, Granulocytes, Dendritic cells, Tumor associated neutrophils, Cancer associated fibroblasts, Adipocytes, Pericytes.

Fibroblasts constitute the majority of cells in TME, thus research of these cell populations is of primary importance. Many fibroblast subpopulations have been described in literature [3] with many different functions and effects on tumor (e. g., forming extracellular matrix, development of inflammation, initiating epithelial mesenchymal transition). Some of these subpopulations were observed in one specific type of cancer (e. g., colorectal cancer) or in one specific tissue (e. g., ovary), yet it is not clear how these populations correspond to each other and if any common hierarchy exists. One way to explore cell populations is to construct gene signatures for them: set of genes, expression patterns of which are unique to given cell types. The purpose of this work was to research different types of fibroblasts and try to build such hierarchy.

We used data about RNA expression of 40 bulk RNAseq fibroblast samples and 1325 single cell RNAseq samples containing 20062 genes to construct gene signatures for three types of stromal cells: activated fibroblasts, resting fibroblasts, perivascular cells. Differentially expressed genes were sorted by biological coherence and overlapped with gene signatures identified by other researchers. These types of cells as well as their sorting strategies were identified in samples from several types of cancer (ovarian cancer, pancreatic cancer) and different types of RNAseq (bulk RNAseq, single-cell RNAseq) and were validated with flow cytometry. To be able to quantitatively measure abundance of these cells using only expression of sample's RNA we used our data to train lightGBM machine learning models to deconvolve them. Finally, models were used to study cohort of patients with pancreatic cancer. We determined lower level of survivability ( $p < 0.05$ ) among patients, who constituted 3<sup>rd</sup> quartile of overall number of activated fibroblasts relatively to better survivability of the first quartile patients (fig. 1). We demonstrated (fig. 2) the first-grade pancreatic cancer differs from the second ( $p < 0.01$ ) and third ( $p < 0.05$ ) grade cancers, containing less activated fibroblasts that were linked to more aggressive type of tumors. These results could be used for more precise patient diagnosis and future treatment.

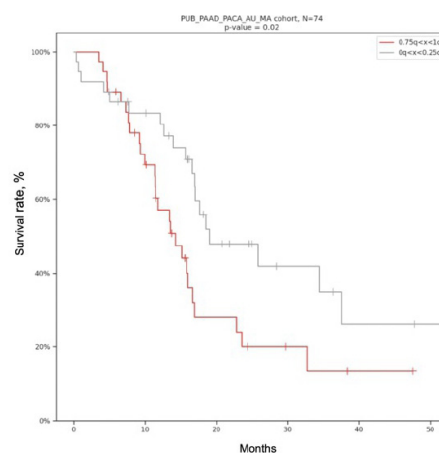


Fig. 1. Overall survivability of patients from different quartiles of activated fibroblasts distribution

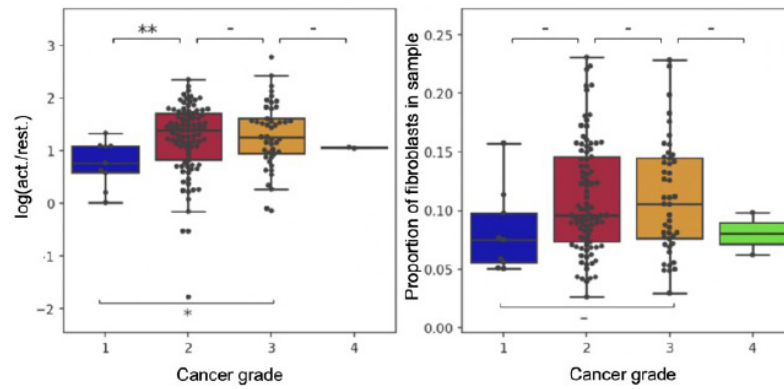


Fig. 2. Structural difference of fibroblasts' composition between various cancer grades

### References

1. Hannahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // Cancer Discov. 2022. Vol. 12 (1). P. 31–46.
2. Balkwill F. R., Capasso M., Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance // J. Cell Sci. 2012. Vol. 125. P. 5591–5596.
3. Han C., Liu T., Yin R. Biomarkers for cancer-associated fibroblasts // Biomark. Res. 2020. Vol. 8 (1).

## ПОИСК СТАРТОВ НАЧАЛА ТРАНСКРИПЦИИ ВБЛИЗИ ПРЕДСКАЗАННЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОМОТОРОВ РИСА И ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ОТКРЫТОСТИ ХРОМАТИНА

А. Н. Бубнова, А. В. Зубрицкий, А. М. Камионская

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

✉ an\_bubnova@mail.ru

### Аннотация

В данной работе исследовались потенциальные промоторные последовательности первой хромосомы генома риса *Oryza Sativa*, предсказанные с помощью алгоритма, основанного на множественных выравниваниях [1]. Последовательности были проверены на наличие вблизи них в направлении 3' (*downstream*) потенциальных, не аннотированных TSS (5'-концы транскрибируемых областей) и на степень открытости хроматина.

Предсказанные *in silico* потенциальные промоторные последовательности требуют дополнительного изучения их свойств, так как алгоритмы предсказания не исключают появления ложноположительных результатов. В данной работе исследовались последовательности из базы данных *Database of Potential promoter sequences* [2], предсказанные с помощью математического алгоритма, основанного на выравниваниях и расчете статистически значимых классов промоторов. Для проверки свойств из вышеупомянутой базы данных было отобрано 126 последовательностей, из которых каждая располагается не ближе 1000 оснований от известных транскриптов и не ближе 200 оснований от SINE-повторов и транспозонов, длина предсказанных отобранных последовательностей варьирует от 428 до 599 оснований. Для подтверждения роли этих последовательностей в геноме в качестве промоторов проводился анализ их свойств, таких как наличие или отсутствие за ними транскрибируемых участков ДНК в направлении 3' (*downstream*) и доступность хроматина для возможности связывания транскрипционных факторов [3].

Поиск транскрибируемых участков ДНК за потенциальными промоторными последовательностями проводился путем анализа результатов секвенирования кэп-анализов экспрессии генов (CAGE-seq) риса *Oryza Sativa*, доступных в SRA NCBI. Данный анализ позволяет картировать большинство сайтов начала транскрипции и, как следствие, их промоторов. Выравнивание отобранных данных секвенирования на геном первой хромосомы риса *Oryza Sativa* проводилось с помощью *bowtie2* с опцией *very-sensitive*. Полученный в результате *bam*-файл был проиндексирован и далее проанализирован в IGV вместе с картированными на геном потенциальными промоторными последовательностями. В результате были отобраны промоторные последовательности, за которыми в направлении 3' присутствовали картированные 5'-области транскрибированных участков из кэп-анализов экспрессии.

Доступность хроматина анализировалась путем изучения данных секвенирования ATAC-seq, также взятых из SRA NCBI, позволяющих распознать открытые участки хроматина, доступные для посадки факторов транскрипции. Такие участки могут помогать в идентификации промоторных последовательностей, а также их активности: чем выше активность промотора, тем выше занятость нуклеосомами за сайтом начала транскрипции и ниже перед ним. Данные секвенирования ATAC-seq были выровнены на геном первой хромосомы риса *Oryza Sativa* с помощью *bowtie2* с опцией *very-sensitive*. Затем полученный и проиндексированный *bam*-файл был визуализирован в IGV вместе с картированными на геном потенциальными промоторными последовательностями, за которыми были ранее картированы 5'-области транскрибируемых участков (потенциальные сайты начала транскрипции). По итогу из всех последовательностей для дальнейшей проверки их *in vivo* были отобраны те, которые расположены в доступной области хроматина для возможности связывания факторов транскрипции и за которыми находятся 5'-области транскриптов.

### Литература

1. Korotkov E. V. et al. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // Symmetry. 2021. Vol. 13, № 6. P. 917.
2. RegSite Database of Potential promoter sequences. URL: <http://victoria.biengi.ac.ru/cgi-bin/dbPPS/index.cgi?orgChr=orsa-chr1;recordIDFrom=;recordIDTo=;segmentFrom=;segmentTo=;matrFrom=;matrTo=;signFrom=;signTo=;fmaxFrom=;fmaxTo=;matrNum=;strDNA=;te=21960;pg=1>.
3. Klemm S. L., Shipony Z., Greenleaf W. J. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome // Nat. Rev. Genet. 2019. Vol. 20, № 4. P. 207–220.

## VIRAL SEQUENCE IDENTIFICATION WITH VIRIDAL PIPELINE<sup>\*</sup>

A. Y. Budkina<sup>1,2</sup>, I. A. Kotov<sup>1,2</sup>, K. F. Khafizov<sup>1</sup>, V. G. Akimkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service  
for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

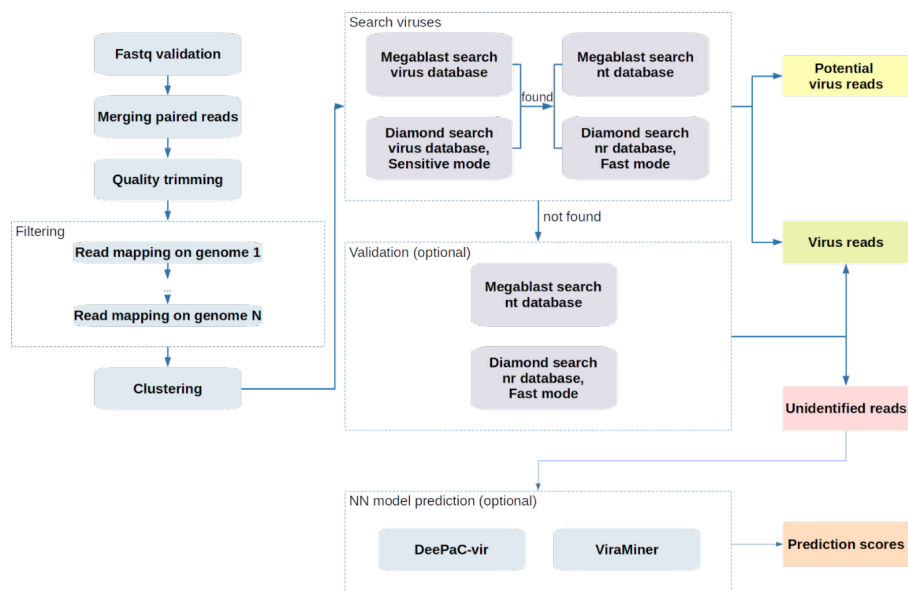
✉ anna.y.budkina@gmail.com

### Abstract

VirIdAl pipeline was developed for the identification of viral sequences in NGS data. By using a two-stage search, VirIdAl detects sequences that are most similar to known viral ones while speeding up the analysis. Additional scans using deep learning models allow for expanding the range of viruses found.

NGS sequencing technologies are becoming increasingly important for viral pathogens identification. Programs for processing the sequencing data should take into account the incompleteness of the available reference databases, the presence of host DNA sequences and other microorganisms in the sample, and a small percentage of viral sequences on a background level. The developed VirIdAl software pipeline classifies reads derived through NGS sequencing and returns a list of viral sequences. The VirIdAl algorithm includes filtering by quality, exclusion of host sequences, clustering, search in nucleotide and amino acid sequences databases, and scanning using deep learning models for detecting virus patterns in nucleotide sequences.

Figure illustrates the steps of the pipeline. The virus search consists of two steps: 1) alignment using viral genome references with high sensitivity and 2) high specificity search in NCBI nr/nt databases. Megablast algorithm is used for nucleotide sequence alignments, and Diamond is used for amino acid sequence alignments. Sequences that were not classified as viral can be re-aligned to nt/nr databases at the additional search stage. Further, deep learning models implemented in programs DeePaC-vir and ViraMiner can be used to scan sequences that were not assigned to any organism. Each sequence is assigned a score that reflects the likelihood that it can be attributed to a virus. Sequences with a high probability to be classified as viral can be further examined. Using different search models can help increase the variety of viruses that are discovered.



The VirIdAl bioinformatics pipeline flow chart

The two-stage search makes it possible to select sequences that are the most similar to known viral ones and to reduce the analysis time. It was shown that various machine learning approaches can be used to discover sequences that have a low degree of similarity with the reference.

<sup>\*</sup> This work was supported by the RSF grant No. 22-24-00078.

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТЕРА ЧЕЛОВЕКА NaPi2b С ЛИГАНДАМИ\*

Р. А. Власенкова<sup>1</sup>, А. С. Козлова<sup>1</sup>, Н. И. Акберова<sup>1</sup>, Р. Г. Киямова<sup>1</sup>, М. В. Богданов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Медицинская школа Макговерна,

Научный центр здравоохранения Техасского университета, Хьюстон, Техас, США

✉ r.mukhamadeeva@yandex.ru

### Аннотация

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b — трансмембранный белок, входящий в семейство фосфатных транспортеров SLC34. Данный белок является маркером рака яичника и других видов рака [1]. Так как потребление фосфатов возрастает в условиях опухолевого микроокружения [2], мы проанализировали взаимодействия аминокислот NaPi2b с лигандами (HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na, PO<sub>4</sub>). Анализ был проведен с учетом мутаций, обнаруженных у онкологических пациентов.

Структура NaPi2b была предсказана *ab initio* и термодинамически стабилизирована методом молекулярной динамики. Дисульфидная связь aa328-350 введена методом контролируемой молекулярной динамики. Молекулярную динамику моделировали с использованием программы NAMD, параметры молекулярной динамики были получены с помощью пакета bio3d и программного обеспечения VMD. Молекулярный докинг лигандов HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na, PO<sub>4</sub> проводили в программе Autodock.

С учетом комплекса аминокислотных параметров при создании сетей разработан алгоритм определения формулы веса вершины. Построены взвешенные графы, вес в которых определялся одним из параметров молекулярной динамики. Параметры узлов взвешенных графов сравнивались с аналогичными параметрами узлов контрольного невзвешенного графа (критерий Крускала — Уоллиса с попарным тестом Уилкоксона). Полученные коэффициенты и значения параметров аминокислот определяют формулу веса вершины. Ранее мы выявили 111 функционально значимых мутаций белка NaPi2b в образцах опухолей [3]. Полученные списки мутаций были наложены на сети взаимодействия аминокислот.

### Аминокислотные остатки NaPi2b, важные для взаимодействия с лигандами

Система	Лиганд			
	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HPO <sub>4</sub>	Na	PO <sub>4</sub>
Связь 328-350	MET1 <b>PRO5</b> GLU6 <b>SER55</b> <b>ASP68 PRO69</b> LEU72 VAL384 LYS385 LEU387 <b>SER389</b> <b>ASP406</b>	MET1 <b>PRO3</b> <b>PRO5</b> GLU6 <b>SER55 ASP68</b> <b>PRO69</b> VAL384 LYS385 LEU387 <b>SER389</b> <b>ASP406</b>	MET1 GLU6 <b>ASP68 PRO69</b> VAL384 LYS385 LEU387 <b>SER389</b> <b>ASP406</b>	MET1 <b>PRO3</b> <b>PRO5</b> GLU6 <b>ASP68 PRO69</b> VAL384 LYS385 LEU387 <b>SER389</b>
Нет связи	SER119 GLN123 LYS128 THR162 <b>SER163</b> SER169 <b>MET170</b> <b>LEU176</b> VAL178 <b>ASP290</b> <b>LYS344</b>	GLN123 LYS128 <b>LEU152</b> THR162 <b>SER163</b> SER169 <b>LEU176</b> <b>ASP290</b> <b>LYS344</b>	GLN123 LYS128 <b>SER163</b> VAL178	THR162 <b>SER163</b> SER169 <b>MET170</b> <b>ASP290</b>

*Примечание.* Жирным выделены аминокислоты, в которых были найдены мутации, курсивом — мутации в опухолевых образцах.

\* Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-14-00166.

© Р. А. Власенкова, А. С. Козлова, Н. И. Акберова, Р. Г. Киямова, М. В. Богданов, 2022



В результате мы идентифицировали аминокислоты, которые оказали наибольшее влияние на структуру NaPi2b и взаимодействовали с лигандами для систем с дисульфидной связью 328–350 и без нее (см. таблицу). В различных системах белка NaPi2b аминокислотные остатки, взаимодействовавшие с лигандами, находились в разных положениях: в системе с дисульфидной связью — во внутриклеточных доменах, а в системе без нее — в трансмембранных и внеклеточных доменах.

Мутации в опухолевых образцах были найдены в следующих аминокислотных остатках, важных для взаимодействия с лигандами: ASP68 (N-концевой домен) и SER389 (внутриклеточный домен) для систем с дисульфидной связью 328–350 и без нее: LEU152 и SER163 (псевдосимметричная петля, содержащая богатый серином функциональный мотив QSSS). Эти аминокислоты взаимодействовали со всеми четырьмя лигандами, но LEU152 — только с  $\text{HPO}_4$ .

Проведен сравнительный анализ сетей взаимодействия аминокислот NaPi2b с отсутствием и присутствием потенциальной дисульфидной связи, в результате чего получен список аминокислотных остатков, в которых обнаружены мутации и которые оказали наибольшее влияние на взаимодействие белка NaPi2b с лигандами.

### Литература

1. Shyian M et al. Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors // *Exp Oncol*. 2011 Jun. Vol. 33 (2). P. 94–98.
2. Bobko A. A. et al. Interstitial Inorganic Phosphate as a Tumor Microenvironment Marker for Tumor Progression // *Sci. Rep*. 2017 Jan. Vol. 24 (7). P. 41233. URL: <https://doi.org/10.1038/srep41233>.
3. Vlasenkova R et al. Characterization of SLC34A2 as a Potential Prognostic Marker of Oncological Diseases // *Biomol*. 2021. URL: <https://doi.org/10.3390/biom11121878>

## OXIDATIVE DAMAGE IS THE SIGNATURE FOR BIRDS MITOCHONDRIAL DNA THYMINE AND GUANINE ENRICHMENT\*

Y. S. Gusarov<sup>1</sup>, A. G. Mikhailova<sup>1,2</sup>, B. E. Efimenko<sup>1</sup>, V. O. Burskaya<sup>3</sup>, K. Y. Popadin<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> *Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*

<sup>2</sup> *Vavilov Institute of General Genetics, Moscow*

<sup>3</sup> *University of Antwerp, Antwerp, Belgium*

<sup>4</sup> *Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Lausanne, Switzerland*

✉ yurguss@mail.ru

### Abstract

Mitochondria is a two — membrane organelle, which takes a major part in oxidative phosphorylation. Main product of this process is ATP. At the same time, in the results of all respiratory processes mitochondrial DNA (mtDNA) is being damaged by reactive oxygen species (ROS). Mutagenic signature of those molecules is still unknown.

Mitochondrial mutational spectrum is very variable across different vertebrate taxons. But the reasons behind those contrasts are still unknown. In recent studies it was shown that level of metabolism is a key factor in differentiations of the mutational spectrum for mammals [1] and fishes [2]. To further investigate this question, we decided to study different bird species. To start our research, we gathered birds mtDNA and ecology data. For that we used NCBI RefSeq [3] and AVONET [4] databases. In result, we acquired a unique data set of bird mtDNA sequence and ecology. Next, we decided to look at the nucleotides' frequencies in 4-fold neutral positions. They showed us that birds have increased numbers of guanine and thymine in their mtDNA. Also, we calculated several metrics to assess mtDNA nucleotide content: *GhAhSkew* (formula 1) [1] and *Stg — Sac* (formula 2) [2].

Formula 1:

$$GhAhSkew = \frac{G - A}{G + A},$$

*GhAhSkew* — metric, describing *GA* — content of mtDNA; *G* — amount of guanine in 4-fold neutral positions; *A* — amount of cytosine in 4-fold neutral positions.

Formula 2:

$$Stg - Sac = (T + G) - (A + C),$$

*Stg — Sac* — metric, describing all 4 nucleotides frequencies; *T* — frequency of thymine in 4-fold neutral positions; *G* — frequency of guanine in 4-fold neutral positions; *A* — frequency of adenine in 4-fold neutral positions; *C* — frequency of cytosine in 4-fold neutral positions.

Then we combined them with different bird ecology. In result, we saw that those metrics for antarctic, omnivore and carnivore birds are higher than for others. This is a result of *Ah → Gh* and *Ch → Th* substitutions, caused by oxidative damage. Omnivore and carnivore birds spend more energy looking for prey and hunting. Antarctic birds need to warm themselves in the cold. After that, we decided to check if mutagenesis is the reason for most mtDNA changes. For that we used PCA and built a biplot. Graph shows us two orthogonal axes. First is frequency of *A* and *G* — this is PC1, describing 52,6 % of our sample. Second is frequency of *C* and *T* — this is PC2, describing 26,7 % of our sample. We can see that differences in nucleotide frequencies, caused by *Ah → Gh* and *Ch → Th* substitutions, are two main components. So we can make a conclusion that mutagenesis, caused by oxidative damage, is the main reason for birds mtDNA changes.

### References

1. Mikhaylova A. G., Mikhailova A. A., Ushakova K. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of *A > G* substitutions on a heavy chain // *Biology*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.460832/>
2. Mikhailova A. G., Iliushchenko D., Shamansky V. A mitochondrial mutational signature of temperature in ectothermic and endothermic vertebrates // *Biology*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1101/2020.07.25.221184>
3. O'Leary N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation // *Nucleic Acids Res.* 2016. T. 44, № D1. C. D733–D745.
4. Tobias J. A., Sheard C., Pigot A. L. et al. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds // *Ecol. Lett.* 2022. Vol. 25. P. 581–597.

\* Supported by RSF № 21-75-20143.

## СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПЕПТИДОВ-МОДУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ-1 \*

Я. И. Заварзина<sup>1</sup>, А. С. Кузнецов<sup>1-3</sup>, Р. Г. Ефремов<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>3</sup> Высшая школа экономики, Санкт-Петербург

✉ zavarzina.iai@phystech.edu

### Аннотация

Гомодимеризация второго трансмембранного сегмента нейраминидазы-1 (TM2 NEU-1) играет важную роль в работе комплекса рецептора эластана (ERC) и в развитии атеросклероза. В данной работе предложена аминокислотная последовательность предполагаемого «пептида-перехватчика», связывающего TM2 в мембране и потенциально способного регулировать его активность, влияя на процесс димеризации белка.

NEU-1 — лизосомальная сиалидаза. Существует также мембранно-связанная форма этого белка в составе ERC [1]. В ферменте выявлены два потенциальных трансмембранных спиральных сегмента (остатки 139–159 и 316–333 — TM1 и TM2 соответственно) [2]. Считается, что гомодимеризация TM2 сегмента NEU-1 играет важную роль в работе ERC в норме и при развитии атеросклероза [2]. Для терапии состояний аномальной активности NEU-1 предложено создать трансмембранный «пептид-перехватчик», связывающий TM2-домен NEU-1 в мембране. Вопреки растущему интересу научного сообщества к нейраминидазе-1, ее мембранная организация в составе рецептора ERC неясна, а структурные и биохимические свойства комплекса сложно определить экспериментально. Для исследования мембранных белков и в особенности их трансмембранных доменов успешно применяется молекулярное моделирование [3, 4]. Цель настоящей работы — предсказание пространственной структуры возможных димерных состояний TM-доменов NEU-1 с участием потенциальных «пептидов-перехватчиков». В качестве модельных пептидов рассматривали модификации последовательности изолированного природного TM2, полученные путем внесения одиночных полярных и неполярных мутаций в среднюю часть трансмембранного сегмента. Возможные димерные конформации предсказывали с помощью алгоритма PREDDIMER. Оценку стабильности димера проводили путем расчета траекторий молекулярной динамики системы в липидном бислое из дипальмитоилфосфатидилхолина. Использовали программный пакет GROMACS. Наиболее перспективные варианты аминокислотной последовательности «пептида-перехватчика» выбирали на основании оценки стабильности формируемых ими комплексов с TM2 NEU-1. Проведенные расчеты позволили отобрать два кандидата на роль «перехватчика» из шести рассмотренных мутантных вариантов и получить пространственные модели комплексов, для которых в дальнейшем будет проведена экспериментальная оценка активности *in vitro*. Полученные результаты рассматриваются в качестве основы для разработки новой стратегии лечения атеросклероза за счет использования пептидных модуляторов мембранно-связанной NEU-1 в составе ERC.

### Литература

1. Lukong K. E. et al. Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 81.
2. Maurice P. et al. New Insights into Molecular Organization of Human Neuraminidase-1: Transmembrane Topology and Dimerization Ability // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 38363.
3. Domanski M. J. et al. Time Course of LDL Cholesterol Exposure and Cardiovascular Disease Event Risk // J. Am. Coll. Cardiol. 2020. Vol. 76. P. 1507.
4. Psachoulia E. et al. Molecular dynamics simulations of the dimerization of transmembrane alpha-helices // Acc. Chem. Res. 2010. Vol. 43. P. 96.

\* Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 18-14-00375.  
© Я. И. Заварзина, А. С. Кузнецов, Р. Г. Ефремов, 2022

## СОЗДАНИЕ БИБЛИОТЕКИ ПРИРОДНОГО РАЗНООБРАЗИЯ АМП\*

А. О. Иванова<sup>1</sup>, С. О. Пипия<sup>2</sup>, И. Е. Елисеев<sup>3</sup>, А. О. Залевский<sup>2</sup>, С. С. Терехов<sup>2</sup><sup>1</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва<sup>3</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет им. Ж. И. Алфёрова РАН

✉ IvanovaAO\_biotech@mail.ru

**Аннотация**

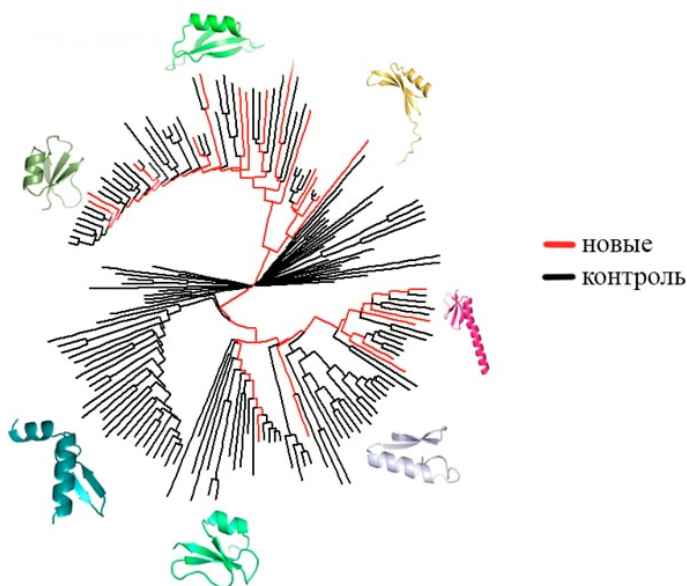
Антимикробные пептиды (АМП) являются перспективными антибиотиками «следующего поколения». В данной работе сконструирована библиотека природного биоразнообразия АМП, а также изучена вторичная структура дефензинов с использованием методов *in silico*, что создает основу для высокоэффективного направленного поиска новых потенциально активных антимикробных пептидов.

Последовательности известных АМП собраны в нескольких специализированных базах данных: APD3 (около 3,3 тыс. уникальных последовательностей), DRAMP (более 22 тыс., 4,4 тыс. природных), DBAASP (18 тыс., 3 тыс. природных). Для конструирования библиотеки отобраны природные пептиды из трех приведенных баз данных, обладающие антибактериальной активностью по отношению к Грам(+) или Грам(-) патогенам и имеющие длину не более 50 аминокислот. Исключены пептиды нерибосомного происхождения, а также имеющие нестандартные аминокислоты в последовательности или посттрансляционные модификации помимо дисульфидных связей. Большое количество последовательностей синтетических АМП из патентов (около 18 тыс. в базе DRAMP) устранено при конструировании библиотеки ввиду высокой вырожденности этого множества, в котором преобладают однотипные наборы точечных мутантов и тривиальные синтетические пептиды, а также в большинстве случаев отсутствуют данные об активности. После объединения множества последовательностей из трех баз данных идентичные последовательности были исключены. В результате отобрано 3,5 тыс. уникальных природных АМП для конструирования библиотеки. После было решено найти потенциально новые АМП. Для этого были выбраны дефензины — катионные пептиды системы врожденного иммунитета, активные в отношении бактерий,

грибков и многих оболочечных и безоболочечных вирусов [1]. Аминокислотные последовательности дефензинов разнообразны, поэтому необходимо использовать данные о третичной структуре для определения пептида к дефензинам, обладающим антимикробной активностью.

Для изучения структуры антимикробных пептидов отобраны 170 дефензинов из APD3. Еще 26 дефензинов, для которых не было ранее показано антимикробной активности, найдены в базе данных InterPro. Для 196 последовательностей проведено моделирование структуры *de novo* при помощи программы AlphaFold 2 [2]. После получения ансамбля моделей и экспериментальных структур АМП была осуществлена их иерархическая кластеризация посредством DaliLite v.5 [3]. Полученные данные использованы для построения дерева АМП среди дефензинов, отображающего биоразнообразие их пространственных структур (см. рисунок).

Структурное дерево АМП (дефенсины).



Дерево антимикробных пептидов (дефензинов), отображающее их структурные особенности. Красным выделены предполагаемые новые антимикробные пептиды, черным — уже известные

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-14-00357.

---

В работе составлена библиотека природного разнообразия антимикробных пептидов, а также построено структурное дерево дефензинов. Показано, что использование методов моделирования структуры АМП *de novo*, в отличие от классических методов линейной биоинформатики, позволяет не только более точно осуществлять иерархическую кластеризацию АМП, но также и эффективно идентифицировать новых перспективных кандидатов с потенциально высокой антимикробной активностью.

#### **Литература**

1. Suresh A., Verma C. Modelling study of dimerization in mammalian defensins (неопр.) // BMC Bioinformatics. 2006. Vol. 7 (5). P. S17.
2. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // Nature. 2021. Vol. 596. P. 583–589.
3. Holm, Liisa. Benchmarking Fold Detection by DaliLite // Bioinformatics. 2019. Vol. 35. P. 5326–5327.

**HGMMX — БАЗА ДАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА\***

Н. С. Ионов, А. С. Колодницкий, А. В. Рудик, В. В. Поройков

НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва

✉ ionov.nikita.serg@gmail.com

**Аннотация**

Представлена свободно доступная в интернете база данных HGMMX (*Host-Gut Microbiota Metabolites of Xenobiotics*), содержащая информацию о низкомолекулярных органических соединениях и их метаболитах, образующихся в ходе биотрансформации с участием ферментов микробиоты кишечника человека.

Метагеном бактерий, населяющих кишечник человека, представляет собой набор генов, который почти в 150 раз превосходит набор генов хозяина [1]. Часть из этих генов кодирует ферменты, функционирование которых значительно расширяет количество потенциальных путей метаболизма ксенобиотиков. Образующиеся метаболиты могут проявлять активность, отличную от исходного соединения, или даже утратить имеющуюся фармакологическую активность, или же, наоборот, приобрести более высокую токсичность. Это может приводить к снижению эффективности фармакотерапии, а также к нежелательным и потенциально опасным для жизни пациента побочным эффектам [2]. Таким образом, анализ биотрансформации низкомолекулярных химических соединений, опосредованной микробиотой кишечника, является одним из важнейших этапов разработки новых лекарственных молекул и репозиционирования уже одобренных к применению лекарств.

Лабораторное тестирование низкомолекулярных химических соединений с целью выявления ассоциаций с микробиотой кишечника — многостадийный и трудоемкий процесс. Систематическое тестирование больших наборов химических структур сопряжено с рядом сложностей, в числе которых отсутствие стандартизованных методик и значительные финансовые затраты на выявление структуры конечных метаболитов. Сужение круга химических соединений, которые потенциально могут быть подвергнуты биотрансформации микробиотой кишечника, и прогнозирование структур их метаболитов возможно с применением *in silico* подходов. Однако разработка и тестирование вычислительных подходов ограничиваются отсутствием в свободном доступе специализированных выборок химических структур веществ, метаболизируемых ферментами микробиоты. Цель настоящей работы — создание базы данных (БД), содержащей информацию о метаболизме низкомолекулярных органических соединений микробиоты кишечника.

В результате проделанной работы из текстов научных публикаций была извлечена информация о более чем 250 различных органических соединений, о бактериях, ассоциированных с проходящими в кишечнике человека реакциями биотрансформации, а также о конечных метаболитах этих веществ.

Созданная БД находится в свободном доступе в интернете (<http://www.way2drug.com/hgmmx>). Представленная информация будет полезна при разработке компьютерных подходов для анализа влияния микробиоты человека на метаболизм низкомолекулярных органических лекарственно-подобных соединений.

**Литература**

1. Qin J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing // *Nature*. 2010. Vol. 464, № 7285. P. 59–65.
2. Ильина Е. Н. и др. Микробиом кишечника и метаболизм лекарственных соединений // *Biomed. Chem.: Res. Methods*. 2021. Т. 4, № 1. С. e00146–e00146.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-15-00396, <https://rscf.ru/project/19-15-00396/>.

## РЕКОНСТРУКЦИЯ И АНАЛИЗ ПАНГЕНОМА КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM* СОРТОВ СИБИРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ\*

Д. И. Каретников<sup>1-3</sup>, М. А. Генаев<sup>1,2</sup>, М. А. Нестеров<sup>1,2</sup>, Н. А. Шмаков<sup>1,2</sup>, С. М. Ибрагимова<sup>1,2</sup>, Г. В. Васильев<sup>1,2</sup>,  
С. В. Тошаков<sup>4</sup>, Т. А. Гавриленко<sup>5</sup>, Д. А. Афонников<sup>1,2</sup>, Е. А. Салина<sup>1,2</sup>, М. В. Патрушев<sup>4</sup>, А. В. Кочетов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Курчатowskiй геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>4</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатowskiй институт», Москва

<sup>5</sup> Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург

✉ karetnikovmit@bionet.nsc.ru

### Аннотация

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования предоставило возможность исследовать не только отдельные геномы, но и целые пангеномы одного вида. Это дает исчерпывающую генетическую информацию, что позволяет глубже изучать селекцию и эволюцию отдельных видов. В нашем исследовании проводились сборка и анализ пангенома картофеля *Solanum tuberosum* сибирской селекции.

Сборка и анализ геномной последовательности сельскохозяйственных растений позволяет изучать функции генов и разрабатывать маркеры для поиска ассоциаций с фенотипическими признаками. Как показывает множество исследований, в геномах разных организмов одного вида могут быть существенные генетические различия, которые невозможно обнаружить на основе одной-единственной референсной последовательности. В свою очередь, сборка целого пангенома позволяет выявить как консервативные гены, являющиеся общими для всех представителей одного вида, так и переменные, специфичные для определенного представителя. Переменные гены особенно важны для изучения сельскохозяйственных растений, так как их функции связаны с устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам, к различным заболеваниям, а также с адаптацией к условиям внешней среды.

В настоящем исследовании изучаемым организмом является картофель (*Solanum tuberosum* L.) сибирской селекции. *S. tuberosum* — важнейшая мировая сельскохозяйственная культура. Более 350 млн т картофеля производится ежегодно во всем мире, а различных сортов насчитывается более 4000.

Секвенирование геномов картофеля 15 сортов сибирской селекции было проведено парными короткими прочтениями на платформе Illumina. Каждый геном собран посредством геномного сборщика MaSuRCA до уровня экзона. На основе полученных сборок идентифицированы белок-кодирующие гены, выявлены консервативные и переменные части пангенома, а также предсказаны их функции. С помощью коротких прочтений определены и аннотированы CNV в геномах сибирских сортов картофеля, а также проведено их сравнение с CNV в геномах нескольких иностранных сортов [1].

Все вычисления проводились с использованием ресурсов ЦКП «Биоинформатика».

### Литература

1. Kyriakidou M., Achakkagari S. R., Gálvez López J. H. et al. Structural genome analysis in cultivated potato taxa // Theor. Appl. Genet. 2020. Vol. 133. P. 951–966.

\* Работа выполнена за счет финансирования Курчатowskiй геномного центра Федерального исследовательского центра ИЦиГ СО РАН, соглашение с Министерством образования и науки РФ № 075-15-2019-1662.

© Д. И. Каретников, М. А. Генаев, М. А. Нестеров, Н. А. Шмаков, С. М. Ибрагимова, Г. В. Васильев, С. В. Тошаков, Т. А. Гавриленко, Д. А. Афонников, Е. А. Салина, М. В. Патрушев, А. В. Кочетов, 2022

---

## НОВЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОБИЛОМА РАСТЕНИЙ И ЕГО ДИНАМИКИ\*

И. В. Киров

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва*

✉ kirovez@gmail.com

### **Аннотация**

Мобилом растений — это набор мобильных элементов растений, способных к транспозиции в геноме. За последние несколько лет появились новые молекулярные и биоинформатические методы, которые позволили значительно расширить знания о мобиломе растений и закономерностях его формирования.

Мобильные элементы генома растений (мобилом) — это одни из главных генераторов генетического и фенотипического разнообразия на нашей планете. Перемещаясь по геному, мобильные элементы способствуют не только возникновению летальных мутаций, но и появлению новых аллелей и транскрипционных программ. Последние исследования показывают, что мобилом играет важнейшую роль в появлении генотипов растений, адаптированных к новым экологическим нишам, меняющимся условиям окружающей среды и иным стрессам. Но какова динамика формирования мобилома в стрессовых условиях и как разные мобильные элементы и молекулярные механизмы растительной клетки взаимодействуют между собой — это вопросы, на которые пока не получены глубокие ответы. Одними из причин слабой изученности мобилома являются низкая активность мобильных элементов, значительная вариабельность и высококопийность в геноме. За последние несколько лет появились новые молекулярные и биоинформатические методы, которые позволили значительно расширить наши знания о мобиломе растений и закономерностях его формирования. К этим методам относятся секвенирование длинными ридами, таргетное секвенирование, новые биоинформатические методы детекции инсерций и эпигенетических и эпитранскриптомных изменений, а также методы выделения и анализа внехромосомных ДНК и вирусоподобных частиц мобильных элементов. В докладе будут представлены новые биоинформатические и молекулярные методы анализа мобилома растений.

---

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10055, <https://rscf.ru/project/22-74-10055/>.  
© И. В. Киров, 2022



## СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВОЙ СТРУКТУРЫ VphA1 ШТАММА *RHODOCOCCUS WRATISLAVIENSIS* Ch628 С ПОМОЩЬЮ MODELLER

Т. Д. Кирьянова<sup>1</sup>, Д. О. Егорова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УО РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра УО РАН

<sup>2</sup> Белгородский государственный университет

✉ kitadi2101@gmail.com

### Аннотация

В ходе анализа полногеномной последовательности ДНК штамма *R. wratislaviensis* Ch628 выявлен участок, принадлежащий гену  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (VphA1). Данный фермент является ключевым в деструкции бифенила и его производных. С применением программы MODELLER 10.2. получена модель третичной структуры VphA1. Установлено, что VphA1<sub>Ch628</sub> характеризуется наибольшим уровнем сходства с нафталин диоксигеназой штаммов рода *Rhodococcus*.

Сравнительное или гомологичное моделирование позволяет получить третичную структуру белка в отсутствие экспериментально полученных данных. Данный метод построения предсказывает третичную структуру заданной белковой последовательности (мишень) на основе ее сопоставления с одним или несколькими белками известной структуры (шаблоны). Сравнительное моделирование включает четыре основных этапа: присвоение кратности, которое определяет сходство между мишенью и по крайней мере одной известной шаблонной структурой; выравнивание целевой последовательности и шаблона(ов); построение модели на основе соответствия выбранному(ым) шаблону(ам); прогнозирование ошибок модели [1, 2].

Цель исследования — построить третичную структуру  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (VphA1) штамма *Rhodococcus wratislaviensis* Ch628, используя алгоритм сравнительного моделирования.

Дедуктивная аминокислотная последовательность VphA1 штамма *R. wratislaviensis* Ch628 получена на основании нуклеотидной последовательности гена *bphA1*, выявленного при анализе полногеномной последовательности штамма с помощью RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Для построения третичной структуры белка использована программа MODELLER 10.2 (<https://salilab.org/modeller/>), веб-сервер структурной биоинформатики — SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>); для визуализации — программа UCSF Chimera 1.16 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Поиск шаблонов осуществляли в базах данных Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>) и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), применяя для выравнивания SWISSMODEL. Для анализа отбирали белковые последовательности с максимальной идентичностью.

Используя алгоритм сравнительного моделирования, отобрали 24 известные третичные структуры  $\alpha$ -субъединиц диок-

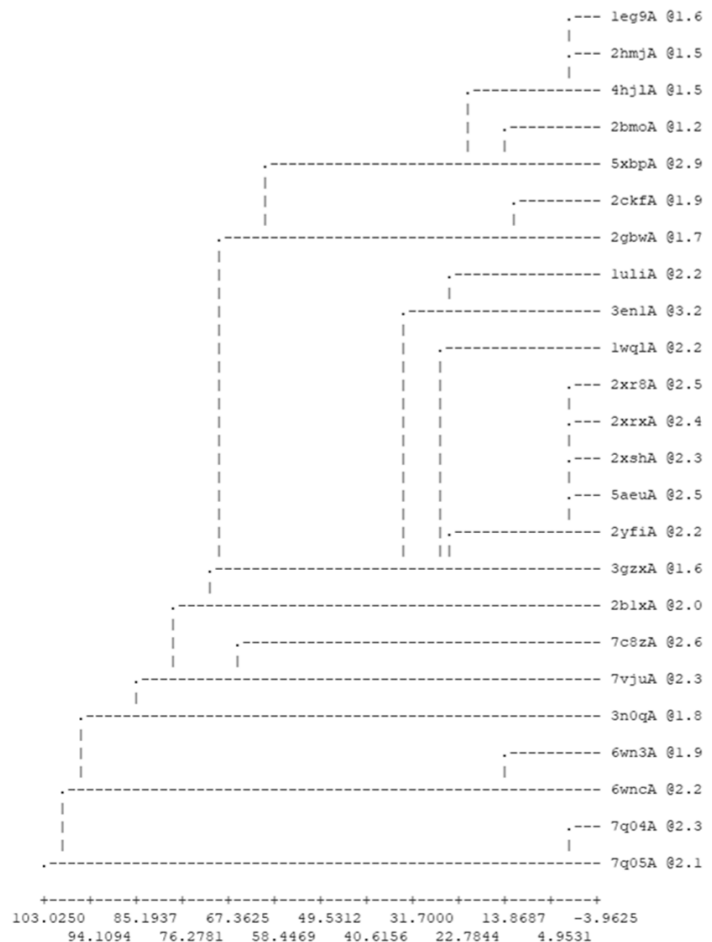


Рис. 1. Средневзвешенная групповая кластеризация третичных структур  $\alpha$ -субъединиц диоксигеназ, созданная в MODELLER 10.2

сигеназ, выявленных в штаммах-деструкторах ароматических соединений родов *Rhodococcus*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Microseira*, *Diaphorobacter*, *Sphingomonas*, *Sphynobium*, *Ralstonia* и *Ruegeria*. Идентичность аминокислотных последовательностей VphA1 штамма *R. wratislaviensis* Ch628 с отобранными ферментами составляла 30,62–93,72 %. В результате кластерного анализа (рис. 1) с учетом аминокислотной идентичности и показателя кристаллографии в качестве шаблона для построения модели третичной структуры VphA1<sub>Ch628</sub> была отобрана  $\alpha$ -субъединица нафталин 1,2-диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB 12038 (идентификатор в базе PDB — 2B1X\_A) (см. рис. 1).

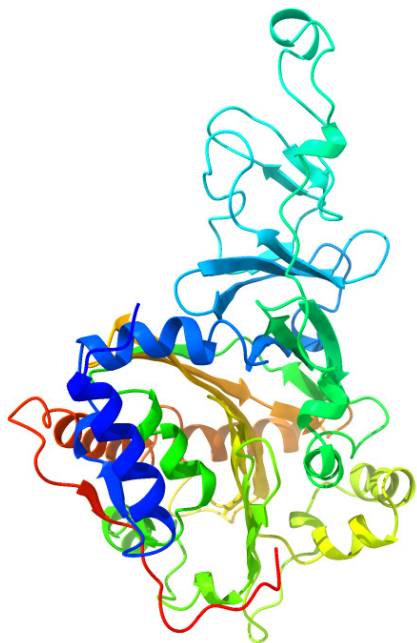


Рис. 2. Модель третичной структуры VphA1<sub>Ch628</sub>

В результате проведенного исследования получена модель третичной структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *R. wratislaviensis* Ch628 (рис. 2). VphA1<sub>Ch628</sub> включает 16  $\alpha$ -спиралей и 19  $\beta$ -тяжей. Площадь поверхности субъединицы составляет  $18,66 \times 10^5 \text{ \AA}^2$ , объем —  $49,40 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ .

Таким образом, применение сравнительного моделирования позволило создать модель третичной структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *R. wratislaviensis* Ch628.

#### Литература

1. Eswar N., Webb B., Martin-Renam M. A. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller // Curr. Protocols Bioinformatics. 2006. Т. 15, № 1. С. 5.6.1–5.6.30.
2. Baig M. S., Manickam N. Homology modeling and docking studies of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl-2, 3-dioxygenase involved in degradation of polychlorinated biphenyls // Int. J. Biol. Macromol. 2010. Т. 46, № 1. С. 47–53.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАСТЕРА-ПРЕКУРСОРА КРИСТАЛЛОВ БЕЛКА ПРОТЕИНАЗЫ К

Ю. В. Кордонская<sup>1,2</sup>, В. И. Тимофеев<sup>2</sup>, Ю. А. Дьякова<sup>1</sup>,  
М. А. Марченкова<sup>2</sup>, Ю. В. Писаревский<sup>2</sup>, М. В. Ковальчук<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

<sup>2</sup> Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

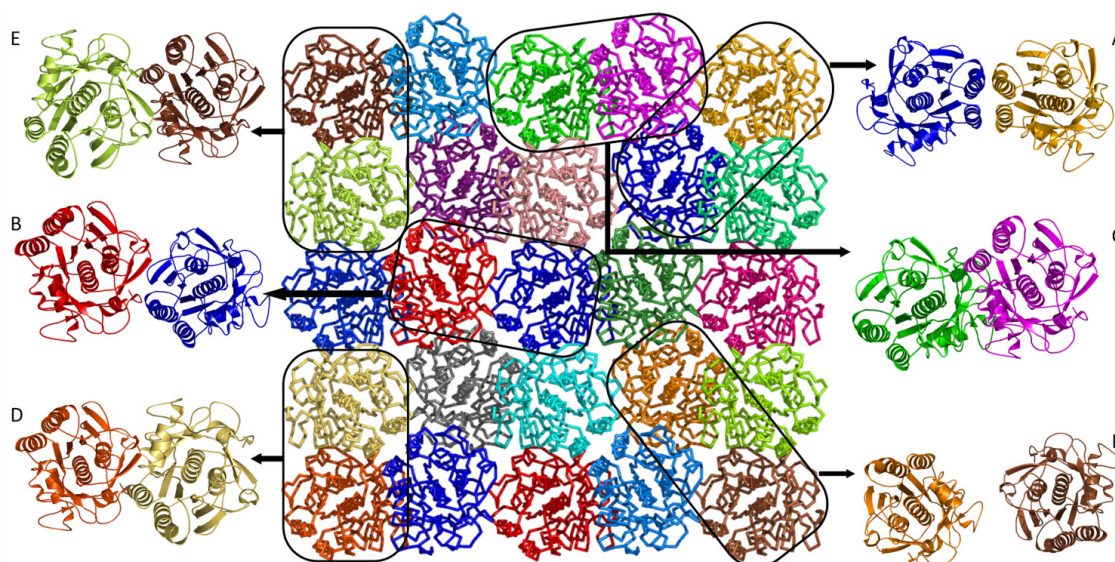
✉ yukord@mail.ru

### Аннотация

С помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей установлено, что перед кристаллизацией протеиназы К в растворе образуются ее димеры, однако неизвестным остался тип наблюдаемого димера. В настоящей работе методом молекулярной динамики смоделировано поведение шести возможных типов димеров протеиназы К. Анализ стабильности выявил наиболее вероятный тип димера, образующегося в растворе протеиназы К перед ее кристаллизацией.

Методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН) ранее обнаружено [1, 2], что перед кристаллизацией белков в растворе образуются кластеры, представляющие трехмерные фрагменты кристаллической структуры белка. Для протеиназы К кластерами-прекурсорами являются димеры [3].

Из кристаллической структуры протеиназы К кластеры-прекурсоры возможно выделить шестью способами (см. рисунок).



Возможные типы кластеров-прекурсоров кристалла протеиназы К (димеры А–F)

Поведение каждого из 6 димеров в кристаллизационном растворе смоделировано с помощью метода молекулярной динамики. По результатам вычислительного эксперимента рассчитаны значения RMSF (*Root Mean Square Fluctuations*, см. таблицу), RMSD (*Root Mean Square Deviation*) и радиуса инерции  $R_g$ , с помощью которых оценивалась стабильность димеров.

### RMSF димеров протеиназы К, усредненные по всем атомам $C_\alpha$

Димер	A	B	C	D	E	F
Среднее RMSF, нм	0,28	0,37	0,24	0,36	0,15	0,48

Из таблицы видно, что наиболее стабильным является димер E, так как он имеет наименьшее усредненное значение RMSF: 0,15 нм, что в 1,6 раза меньше, чем у следующего по стабильности димера (C) с RMSF — 0,24 нм.

Аналогично из полученных графиков RMSD и  $R_g$  следует, что димер Е лучше остальных сохраняет исходные строение и объем. Таким образом, в растворе перед кристаллизацией протеиназы К наиболее вероятно образование димера типа Е.

#### **Литература**

1. Kovalchuk M. V., Blagov A. E., Dyakova Y. A. et al. Investigation of the Initial Crystallization Stage in Lysozyme Solutions by Small-Angle X-ray Scattering // *Cryst. Growth Des.* 2016. Vol. 16, № 4. P. 1792–1797.
2. Marchenkova M. A., Volkov V. V., Blagov A. E. et al. In situ study of the state of lysozyme molecules at the very early stage of the crystallization process by small-angle X-ray scattering // *Crystallogr. Rep.* 2016. Vol. 61, № 1. P. 5–10.
3. Boikova A. S., D'yakova Y. A., Il'ina K. B. et al. Investigation of the Pre-crystallization Stage of Proteinase K in Solution (Influence of Temperature and Precipitant Type) by Small-Angle X-Ray Scattering // *Crystallogr. Rep.* 2018. Vol. 63, № 6. P. 865–870.

## АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА КОРРЕЛЯЦИЮ МЕЖДУ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ И УРОВНЕМ БЕЛКА, У РАЗЛИЧНЫХ ПРОКАРИОТ

А. Е. Коренская<sup>1,2</sup>, Ю. Г. Матушкин<sup>3</sup>, С. А. Лашин<sup>1,2</sup>, А. И. Клименко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

✉ korenskaia@bionet.nsc.ru

### Аннотация

В данной работе анализировались коэффициенты корреляции между индексами эффективности элонгации трансляции и экспрессией генов на уровне белка для 25 прокариот. В результате выявлен ряд факторов, ассоциированных со значением коэффициента корреляции и позволяющих оценить возможность предсказания экспрессии генов у исследуемого организма.

Оценка экспрессии генов на уровне белка на основе геномных данных представляет большой интерес для решения различных биотехнологических и исследовательских задач. На некоторых организмах было показано, что экспрессия генов на уровне белка коррелирует с эффективностью элонгации трансляции, которая зависит, во-первых, от кодонного состава мРНК. Известно, что частота встречаемости синонимичных кодонов различается как между видами, так и среди генов одного организма, и использование редких кодонов замедляет синтез белка [1]. Во-вторых, наличие вторичных структур затормаживает движение рибосомы по мРНК [2].

Ранее в ИЦИГ СО РАН был разработан программный комплекс ELoE, позволяющий оценить эффективность элонгации трансляции на основе вышеперечисленных признаков [3]. Проанализирована корреляция этих оценок с экспериментально измеренным уровнем экспрессии у *S. cerevisiae*, *H. pylori* [4] и *M. gallisepticum*. В данной работе анализ проводился впервые с привлечением геномных и протеомных данных (LC-MS/MS) для различных групп прокариот, включая фотосинтетические, патогенные и экстремофильные организмы.

В результате было показано, что коэффициенты корреляции между экспрессией генов и индексами эффективности элонгации трансляции значительно варьируют среди организмов (от 0,12 до 0,65). Выявлен ряд факторов, ассоциирующийся с уровнем корреляции. Первый фактор — тип элонгации трансляции: наиболее высокие коэффициенты корреляции получены для организмов, эффективность элонгации трансляции которых зависит от кодонного состава (внутри данной группы среднее значение коэффициента корреляции 0,57). Второй фактор — филогенетическая принадлежность: высокие коэффициенты корреляции наблюдались у бактерий, относящихся к классу Bacilli (0,59). Также в качестве фактора выделено минимальное время, необходимое для деления организма, — данный параметр отрицательно коррелирует с анализируемыми коэффициентами корреляции. Кроме того, продемонстрирована корреляция между эффективностью элонгации трансляции генов рибосомных белков и значением коэффициента корреляции между уровнем белка и эффективностью элонгации трансляции генов организма. Это подтверждает резонность использования рибосомальных генов для определения типа эффективности элонгации трансляции, реализованного в ELoE. Полученные результаты полезны для дальнейшего совершенствования методов прогнозирования экспрессии генов.

### Литература

1. Mohammad F., Green R., Buskirk A. R. A systematically-revised ribosome profiling method for bacteria reveals pauses at single-codon resolution // *Elife*. 2019. Vol. 8. P. 1–25.
2. Qu X. et al. The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation. // *Nature*. 2011. Vol. 475, № 7354. P. 118–121.
3. Sokolov V. et al. Web application for automatic prediction of gene translation elongation efficiency // *J. Integr. Bioinform.* 2015. Vol. 12, № 1. P. 256.
4. Vladimirov N. et al. Correlation of codon biases and potential secondary structures with mRNA translation efficiency in unicellular organisms // *Mol. Biol.* 2007. Vol. 41, № 5. P. 843–850.

## АНАЛИЗ ГЕННЫХ СЕТЕЙ ВИТИЛИГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОНЛАЙН-ИНСТРУМЕНТОВ БИОИНФОРМАТИКИ

А. В. Коробейникова<sup>1,2</sup>, Ш. Ш. Кабиева<sup>2</sup>, М. Г. Косенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «ЦСП» ФМБА РФ, Москва

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

✉ aaaniich@yandex.ru

### Аннотация

Витилиго — аутоиммунное заболевание, обусловленное разрушением меланоцитов, что ведет к депигментации участков кожи [1]. Эта патология, по разным данным, встречается у 0,5–2 % людей во всех возрастах повсеместно [2].

Несмотря на оценку этого заболевания лишь как косметического дефекта в связи с отсутствием тяжелых анатомических и физиологических негативных воздействий, данная болезнь может крайне неблагоприятно влиять на психологическое состояние и уровень жизни пациентов. Такие современные методы лечения, как фототерапия (псорален в комбинации с ультрафиолетом А, узкополосным ультрафиолетом В), топическая терапия (кортикостероиды и ингибиторы кальциневрина) и систематическое лечение кортикостероидами, показывают низкую практическую эффективность и финансовую обременительность, что делает проблему изучения новых методов лечения крайне актуальной [3].

Фундаментальной основой данной работы является анализ реконструкции генных сетей для набора генов развития заболевания, а также сравнительный анализ категорий онтологии генов. Эта методика ранее показала свою эффективность в качестве подхода к изучению механизмов, лежащих в основе прогрессирования различных болезней [4–6]. Для ключевых генов, полученных в результате анализа структуры генной сети, рассмотрены варианты поиска лекарственных средств.

Интернет-ресурсы OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <https://omim.org/>) и GeneCards ([GeneCards.org](https://www.genecards.org/)) были использованы для реконструкции списка генов. Произведена фильтрация и сортировка данных, получен финальный список для дальнейшего анализа. DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), GOST (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) и ресурс PANTHER (*Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships*, <http://pantherdb.org/>) применялись для анализа категорий онтологий генов, matscape (<https://metascape.org/>) — для анализа обогащения путей. Выявлены наиболее значимые категории для генов витилиго: меланосомная мембрана (*melanosome membrane*) и пигмент гранулы мембраны (*pigment granule membrane*). Далее использованы онлайн-инструменты биоинформатики GeneCards (<https://genecards.org/>), Reactome (<https://reactome.org/>), GeneMANIA (<https://genemania.org/>) и STRING-DB (<https://string-db.org/>) для аннотирования списка генов и реконструкции сети. С опорой на анализ сети и оценки значимости по FDR, полученной с помощью описанных инструментами, составлен список наиболее значимых генов. Завершающим этапом работы является сопоставление результатов с имеющимися литературными данными о вариантах лечения витилиго, а также рассмотрение возможности новых подходов в борьбе с выбранным заболеванием.

### Литература

1. Chen J., Li S., Li C. Mechanisms of melanocyte death in vitiligo // *Med. Res. Rev.* 2021 Mar. Vol. 41 (2). P. 1138–1166.
2. Bergqvist C., Ezzedine K. Vitiligo: A Review // *Dermatology*. 2020. Vol. 236 (6). P. 571–592.
3. Frisoli M. L., Essien K., Harris J. E. Vitiligo: Mechanisms of Pathogenesis and Treatment // *Annu. Rev. Immunol.* 2020. Apr. 26. Vol. 38. P. 621–648.
4. Gubanova N. V., Orlova N. G., Dergilev A. I. et al. Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools // *J. Integr. Bioinformatics*. 2021. Vol. 18 (4). P. 20210031.
5. Tiis R. P., Osipova L. P., Galieva E. R. et al. N-acetyltransferase (NAT2) gene polymorphism and gene network analysis // *Biomeditsinskaya khimiya*, 2021. Vol. 67 (3). P. 213–221.
6. Kawsara M., Taza T. A. et al. Analysis of gene network model of Thyroid Disorder and associated disease: A bioinformatics approach // *Informatics Med. Unlocked*. 2020.

## РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОЙ ИНФРАСТРУКТУРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ И ОБНОВЛЕНИЯ БОЛЬШИХ ПРАЙМЕРНЫХ НАБОРОВ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

И. А. Котов<sup>1,2</sup>, В. В. Саенко<sup>1</sup>, Н. И. Борисова<sup>1</sup>, А. А. Колесников<sup>1</sup>,  
Л. Ю. Кондрашева<sup>1</sup>, Е. В. Тиванова<sup>1</sup>, К. Ф. Хафизов<sup>1</sup>, В. Г. Акимкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ ivan.kotov@phystech.edu

### Аннотация

В данной работе представлены методики, выработанные при секвенировании SARS-CoV-2 в Центральном научно-исследовательском институте эпидемиологии Роспотребнадзора в 2021–2022 гг. Особое внимание уделено программам, облегчающим и ускоряющим создание и обновление наборов праймеров для мультиплексной ПЦР, используемой при пробоподготовке для секвенирования методами следующего поколения (NGS).

Изучение биоразнообразия вирусов — важная задача для фундаментальной науки и прикладных исследований. В частности, информация о представленности различных вирусов и их вариантов в популяции их носителей может иметь важное эпидемиологическое значение. Примером такого случая является начавшаяся в 2020 г. пандемия SARS-CoV-2, при этом некоторые всплески заболеваемости, помимо прочих факторов, были обусловлены появлением новых вариантов вируса.

Надежная методика определения вирусного штамма в образце — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Однако у предлагаемого метода есть ряд недостатков, критических при исследовании вирусного разнообразия. Прежде всего, для обнаружения каждой отдельной мутации в геноме исследуемого патогена необходимо иметь в наличии отдельную пару праймеров или флуоресцентный зонд. Кроме того, метод ОТ-ПЦР позволяет выявлять лишь описанные ранее мутации. Таким образом, перед нами возникла необходимость в разработке методики, допускающей более универсальный подход к исследованию различных вариантов SARS-CoV-2, а также позволяющей обнаруживать широкий спектр изменений в геноме, в том числе не описанных ранее.

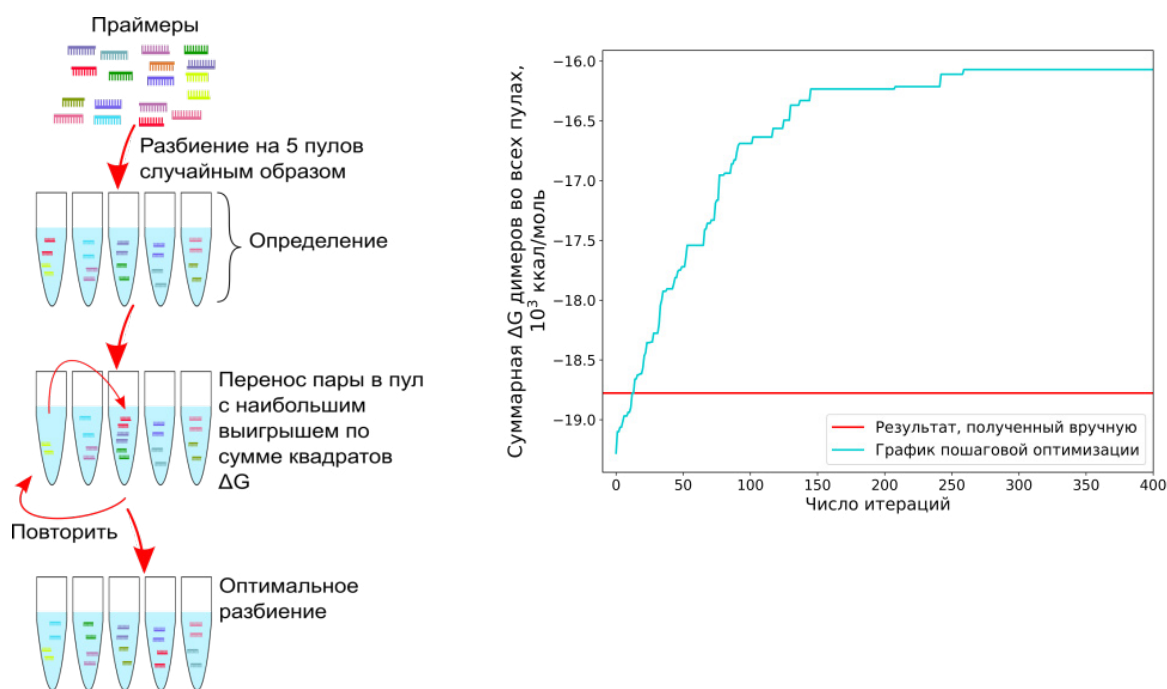


Рис. 1. Принципиальная схема работы алгоритма поиска оптимального разбиения праймеров для демультимплексной ПЦР на пулы (представлен случай разбиения на 5 пулов).

Слева представлен график изменения суммарной ΔG во всех пулах от шага работы алгоритма

В качестве альтернативы методу ОТ-ПЦР в данной работе разработана методика установления варианта SARS-CoV-2 на основе NGS. Благодаря праймерам, содержащим адаптерные последовательности, а также введению ограничений на расстояния между местами посадки праймеров удалось снизить стоимость исследования отдельного образца.

При разработке праймеров, используемых для мультиплексной ПЦР на одном из этапов пробоподготовки перед NGS, для их оптимального разбиения на пулы, минимизирующего появление праймерных димеров, нами разработано программное решение, описанное на рис. 1.

На основе анализа изменения термодинамического потенциала Гиббса ( $\Delta G$ ) для реакций образования праймерных димеров для набора, созданного на основе праймеров ARTIC V3, были получены новые пулы, в которых число корректно работающих пар (более 10 прочтений) выросло с 82 до 89 по сравнению с ручным разбиением, что позволило существенно упростить дальнейшую оптимизацию набора.

Обнаружено, что в ряде случаев отдельные праймеры наборов переставали корректно работать, например, в связи с единичными олигонуклеотидными заменами в местах их посадки. При замене таких праймеров важно проверять новые олигонуклеотиды на их способность образовывать димеры с праймерами, уже формирующими пул и демонстрирующими стабильную работу. Для этой цели также была разработана программа, помогающая точно заменять праймеры в больших пулах на основе анализа  $\Delta G$  возможных димеров (рис. 2).

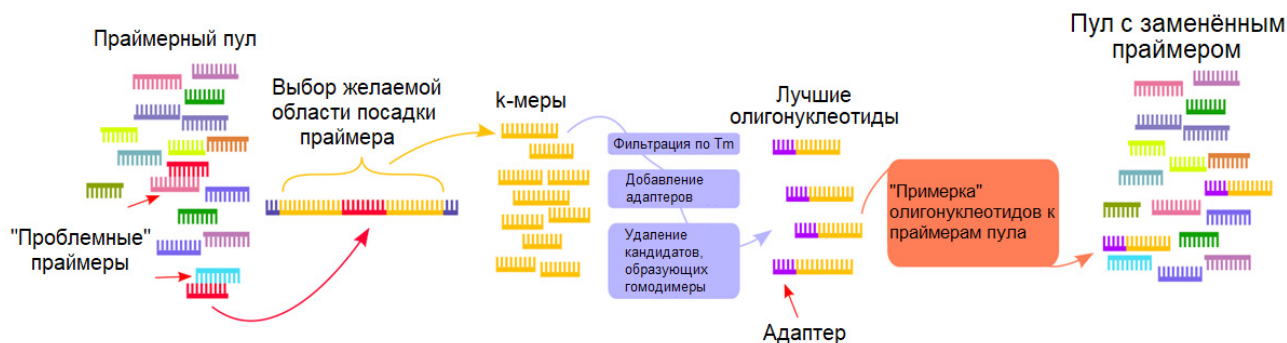


Рис. 2. Принципиальная схема работы алгоритма замены единичных праймеров для демultipлексной ПЦР в большом пуле

Программа позволила точно заменить 3 праймера в наборе для амплификации гена S-белка SARS-CoV-2, в котором 3 пары не обеспечивали удовлетворительного покрытия. После замены праймеров данный набор создал стабильное покрытие на всем целевом участке генома SARS-CoV-2.

В итоге благодаря применению модифицированных праймеров, а также созданным в ходе работы программным решениям мы повысили эффективность исследования биоразнообразия SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации.



## ОСОБЕННОСТИ ФРАГМЕНТИРОВАНИЯ СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ\*

А. Д. Котова<sup>1</sup>, А. П. Коваль<sup>1</sup>, Ю. В. Житнюк<sup>1</sup>, Д. М. Чудаков<sup>1</sup>, Н. Е. Кушлинский<sup>2</sup>, Д. С. Щербо<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва

✉erma0711@gmail.com

### Аннотация

У больных онкологическими заболеваниями свободно циркулирующая внеклеточная ДНК (сцДНК) плазмы крови содержит фракцию фрагментов ДНК опухолевого происхождения. Это позволяет провести неинвазивный анализ опухолевой ДНК, который лежит в основе набора методов, известных под обобщенным названием «жидкостная биопсия». В последние годы, наряду с анализом соматических мутаций и статуса метилирования, активно изучается диагностический потенциал характеристик, связанных с неравномерностью фрагментирования ДНК в различных участках генома.

**Цель исследования** — проверка возможности использования особенностей фрагментирования свободно циркулирующей ДНК плазмы крови для определения присутствия опухоли.

### Материалы и методы

Анализ выполнен на ранее полученном нами наборе данных ( $n = 115$ ), содержащем информацию об относительных координатах концов фрагментов сцДНК и их последовательностях в 41 опухоль-специфичном регионе открытого хроматина. В набор данных вошли результаты секвенирования сцДНК больных почечно-клеточным раком различных клинических стадий (I:  $n = 19$ , II:  $n = 6$ , III:  $n = 20$ , IV:  $n = 11$ ; итого 56) и здоровых людей ( $n = 59$ ). Для описания разнообразия сайтов расщепления сцДНК в каждом анализируемом регионе вычислялся индекс энтропии Шеннона. Полученные значения, наряду с частотами концевых динуклеотидов, использовались в качестве предикторов при классификации методом опорных векторов в среде R с помощью коллекции библиотек *tidymodels*. Набор данных был разделен на обучающую ( $n = 79$ ) и тестовую ( $n = 36$ ) выборки. Поиск оптимальных гиперпараметров и оценка характеристик классификатора проводились на обучающей выборке с 10-кратной кросс-валидацией. Итоговая модель была обучена на полной обучающей выборке и валидирована на тестовом наборе данных.

### Результаты

Классификатор присваивает каждому образцу балл патогенности (рис. 1), отражающий вероятность того, что образец получен от пациента с онкологическим заболеванием.

Полученная модель способна разделять образцы сцДНК больных раком почки и здоровых людей со средним значением площади под ROC-кривой (AUC) на обучающей выборке 0,918 (SD = 0,1, 10-кратная кросс-валидация) и тестовой выборке AUC = 0,883 (рис. 2). Медианное значение балла патогенности для образцов, полученных от здоровых людей в тестовой выборке, составило 0,143. При этом для ранних (I–II) и поздних (III–IV) стадий рака почки соответствующие значения достигли 0,715 и 0,819 соответственно.

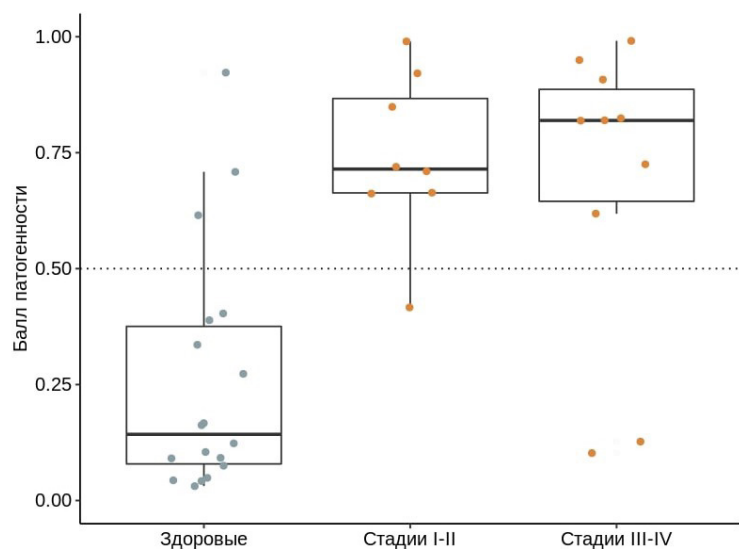


Рис. 1. Образцы сцДНК из тестовой выборки, разделенные на полученные от здоровых людей (серый) и больных раком почки (оранжевый) по присвоенному баллу патогенности

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 20-75-10008.  
© А. Д. Котова, А. П. Коваль, Ю. В. Житнюк, Д. М. Чудаков, Н. Е. Кушлинский, Д. С. Щербо, 2022

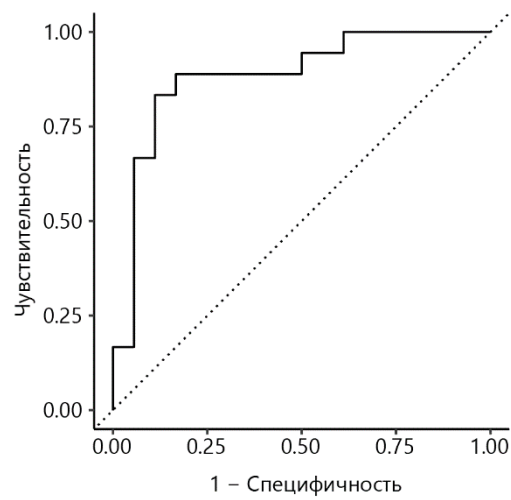


Рис. 2. ROC-кривая, характеризующая чувствительность и специфичность при классификации тестовой выборки ( $n = 36$ ). AUC = 0,883

### Выводы

Распределение сайтов предпочтительного расщепления сцДНК плазмы крови в сочетании с концевыми последовательностями нуклеотидов может рассматриваться в качестве опухолевого маркера при раке почки. Эти характеристики доступны при анализе результатов высокопроизводительного секвенирования сцДНК и могут дополнить набор методов жидкостной биопсии вместе с другими маркерами или использоваться как самостоятельные аналиты.

**АНАЛИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ  
ПРИЗНАК-ОРИЕНТИРОВАННЫМ МЕТОДОМ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ  
ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП\***

А. И. Кропочев<sup>1,2</sup>, С. А. Лашин<sup>1-3</sup>, А. И. Клименко<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

<sup>2</sup> *Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

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

✉ kropochev@bionet.nsc.ru

**Аннотация**

Разработана методика, позволяющая проводить функциональный анализ сообщества, реализующий признак-ориентированный подход. Использование этого метода для анализа синтетического сообщества, в котором число видов строго фиксировано, помогает раскрыть проблему соотношения таксономии и функции. Данный метод был также проверен с помощью независимых таксономических данных.

Микробиом кишечника человека — сложная, постоянно меняющаяся экосистема из триллионов бактерий. Он состоит из большого количества видов, некоторые из которых недостаточно хорошо охарактеризованы. Кроме того, для бактериальных сообществ нередки события горизонтального переноса генов. Следовательно, исследователям может быть трудно предсказать функции определенных таксономических групп в сообществе. Мы полагаем, что попытка выявить экологические отношения в микробном сообществе, если сместить акцент с таксономии на экологическую функцию, может быть очень перспективной.

В данной работе используются общедоступные данные о синтетических сообществах кишечника человека, полученные при изучении влияния диеты на стабильность муцинового слоя [1]. Функциональный анализ сообщества проводился методом количественной оценки экологических функциональных групп.

Проверка продемонстрировала соответствие закономерностей изменения численности функциональных групп между оценками, полученными по разработанной методике, и независимыми таксономическими оценками. Сравнение результатов с другим распространенным методом функционального анализа (HumanN 3) показало применимость разработанного метода и его аналитическую мощьность для исследования таких процессов, как ацетогенез, образование бутирата, сульфатредукция и распад муцина в кишечнике человека.

**Литература**

1. Desai M. S., Seekatz A. M., Koropatkin N. M. et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility // Cell. 2016. Vol. 167. P. 1339–1353.e21.

---

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых ученых — кандидатов наук (№ МК-3363.2022.1.4).

© А. И. Кропочев, С. А. Лашин, А. И. Клименко, 2022

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ КАК МОДЕЛЕЙ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/cJ

Д. К. Латыпова<sup>1,2</sup>, А. В. Каныгина<sup>1</sup>, Е. И. Шарова<sup>1</sup>, Т. В. Петрова<sup>1</sup>, Л. О. Скородумова<sup>1</sup>, В. Н. Лазарев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины

Федерального медико-биологического агентства России, Москва

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ dialat00@mail.ru

### Аннотация

В данной работе представлена оценка применимости модели химической индукции карциномы толстого кишечника у мышей BALB/cJ под воздействием AOM/DSS для проверки эффективности препаратов иммунотерапии. Проведена оценка профиля соматических мутаций и изменения экспрессионного профиля образцов. Частично сопоставлены результаты с человеческой моделью колоректального рака.

Животная модель химически индуцированного колоректального рака с использованием AOM/DSS — перспективный метод исследования данного заболевания [1]; опухолевый процесс является результатом комбинированного воздействия мутагена и воспалительного агента, что соответствует современным представлениям об одном из возможных механизмов возникновения sporadic колоректального рака у человека [2]. Молекулярно-генетическая характеристика данной модели необходима для понимания ее схожести с канцерогенезом у человека и дальнейшей применимости в изучении возможностей иммунотерапевтических агентов.

Библиотеки тотальной РНК для 7 опухолевых образцов, 3 образцов смежной ткани кишечника без опухолевых изменений и 3 образцов ткани кишечника мышей контрольной группы секвенированы с помощью HiSeq 2500. Идентификация соматических мутаций производилась утилитой Mutect2, для анализа дифференциальной экспрессии генов использован пакет edgeR. Суммарно во всех опухолевых образцах в 972 генах идентифицировано 1848 соматических мутаций (от 61 до 634 на образец, медиана 234), затрагивающих аминокислотную последовательность белка, большую часть которых (90 %) составляли однонуклеотидные замены. Среди наиболее часто мутированных генов (в более чем половине образцов) были *Kmt2d*, *Chd8* и *Setd2*.

Анализ экспрессионного профиля выявил 355 генов, экспрессия которых значимо изменилась между контрольной группой и опухолевыми образцами. Изучение обогащения метаболических путей показало значимые ( $p < 0,05$ ) изменения в сигнальных каскадах Wnt и IL-17. В опухолевых образцах по сравнению с контрольными, а также с образцами из смежной ткани кишечника значимо увеличена экспрессия Wnt5a, Wnt6, Wnt10a (минимум в 5 раз) и в 9 раз гена простагландинсинтетазы (*Ptgs2*). Известно, что простагландин E2 активирует компоненты классического Wnt сигнального пути и является драйвером прогрессии колоректального рака [3], а также индуцирует секрецию провоспалительного цитокина IL17, которая повышена в сыворотке и тканях пациентов с колоректальным раком. Полагают, что этот цитокин играет важную роль в прогрессии рака, так как ингибирует инфильтрации CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов и T-регуляторных лимфоцитов [4, 5].

Оценка общей инфильтрации тканей лейкоцитами на основании экспрессии общего лейкоцитарного антигена (*Ptgc*) показала значительное повышение инфильтрации в образцах, полученных из проксимальной части кишки мышей, подвергшихся действиям AOM и DSS, по сравнению с дистальными фрагментами с опухолями и кишкой контрольных мышей. Данное явление может быть связано с истончением и изъязвлением эпителия вследствие активного воспалительного процесса.

Анализ экспрессии контрольных точек иммунного ответа показал, что экспрессия лиганда фактора некроза опухоли (*Tnfsf9*) и его рецептора в опухолевых образцах возрастает в 3 раза относительно контрольных, что позволяет рассматривать его как возможную мишень для исследования иммунотерапевтических подходов с использованием ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

### Литература

1. Parang B. et al. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer // *Gastrointestinal Physiol. Diseases*. 2016. Vol. 1422. P. 297–307.
2. Terzić J. et al. Inflammation and Colon Cancer // *Gastroenterology*. 2010. Vol. 138. P. 2101–2114.
3. Hidalgo-Estévez A. M. et al. Cyclooxygenase 2-regulated genes an alternative avenue to the development of new therapeutic drugs for colorectal cancer // *Frontiers Pharmacol*. 2020. Vol. 11. P. 533.
4. Ernst M., Putoczki T. IL-17 cuts to the chase in colon cancer // *Immunity*. 2014. Vol. 41. P. 880–882.
5. Polese B. et al. Prostaglandin E2 amplifies IL-17 production by  $\gamma\delta$  T cells during barrier inflammation // *Cell Rep*. 2021. Vol. 36. P. 109456.

## ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЙ КОНВЕЙЕР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА СЕМЕЙСТВ ОРТОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ: ИЗУЧЕНИЕ ФОСФОЛИПАЗ A2 У ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ\*

М. Е. Лачынова<sup>1-3</sup>, И. И. Турнаев<sup>1,2</sup>, Д. А. Афонников<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Курчатowskiй геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет

✉ lachynova @bionet.nsc.ru

### Аннотация

В данной работе предложен вычислительный конвейер для идентификации и последующего структурного и эволюционного анализа семейств многодоменных белков. Он позволяет в наборе аминокислотных последовательностей из полногеномных данных идентифицировать последовательности на основе заданного набора доменов, формировать набор ортогрупп для этих последовательностей, изучать вариации доменного состава в процессе эволюции и реконструировать филогенетические отношения в семействах белков.

Вычислительный конвейер реализован на основе языка конвейерной обработки Snakemake и использован для анализа фосфолипаз A2, ферментов, которые катализируют гидролиз фосфолипидов [1]. Эти белки также широко представлены у млекопитающих и выполняют ряд важных базовых функций на уровне клетки и всего организма. Нарушение функций человеческой фосфолипазы A2 часто ассоциируется с раком. Паразитические черви представляют угрозу здоровью населения в Сибири. Заболевания, вызванные ими, могут вызывать осложнения: желчекаменную болезнь или рак [2]. Таким образом, фосфолипазы представляют интерес для изучения, поскольку могут участвовать в процессе взаимодействий «паразит — хозяин».

Проведен поиск белков этого семейства в геномах 36 организмов плоских червей. Впервые идентифицированы классы фосфолипаз A2 из 11 семейств. Изучена первичная структура и доменная композиция найденных белков PLA2.

Полученный биоинформатический конвейер может использоваться для поиска и анализа многодоменных белков для широкого класса таксонов.

### Литература

1. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. М.: Высш. шк., 1998.
2. Пахарукова М. Ю. Структурно-функциональная организация системы метаболизма ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*. Rivolta, 1884.

\* Работа выполнена за счет финансирования Курчатowskiй геномного центра Федерального исследовательского центра ИЦиГ СО РАН, соглашение с Министерством образования и науки РФ № 075-15-2019-1662.

© М. Е. Лачынова, И. И. Турнаев, Д. А. Афонников, 2022

---

**FROM ECOLOGY TO MITOCHONDRIAL GENETICS OF NEMATODES: COLONIZERS VERSUS PERSISTERS ARE MORE T RICH DUE TO THEIR HIGHER RATE OF THE MOLECULAR CLOCKS**V. V. Lobanova<sup>1</sup>, B. E. Efimenko<sup>1</sup>, K. Y. Popadin<sup>2</sup><sup>1</sup>*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*<sup>2</sup>*Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Lausanne, Switzerland*✉ [valeriavlobanova@gmail.com](mailto:valeriavlobanova@gmail.com)**Abstract**

The lifestyle of nematodes, expressed on the “colonizers-persisters” scale, affects the content of thymine in the mitochondrial genome. This is consistent with known statements about the increase in the rate of mutations in species with a higher rate of molecular evolution.

Free-living organisms of phylum *Nematoda* can be ranked according to the colonizer-persister scale (cp-scale), which is broadly comparable to r-K strategies, where “colonizers” have a faster juvenile period, higher fertility, and smaller body size, while “persisters” have a longer juvenile period, lower fertility, and larger body size [1]. In this project we hypothesized that life-history traits (cp-scale) can affect the pattern of mtDNA mutagenesis and evolution.

Analysing all available complete mitochondrial genomes of free-living nematodes, we build a phylogenetic tree and reconstructed mutational spectrum for each monophyletic group of nematodes. In line with the recent mutation accumulation experiment [2] we observed two the most common transitions in mtDNA of all nematodes: C > T and G > A. To uncover causes of fluctuations in mtDNA mutational spectra between different nematodes we performed an association analyses: we correlated the colonizer-persister status of each species with its nucleotide composition of the mitochondrial genome: the entire mitochondrial genome, third codon positions, and four-fold degenerate codon positions. In all the analyses there was a significant increase in the thymine content among the colonizers (cp-1), as compared to persisters (cp-5).

The obtained result is in line with the faster rate of molecular evolution in colonizers, where the most common mtDNA transition, C > T, click faster per the unit of time. Further analyses of mtDNA mutational spectra of parasitic nematodes with extremely complex life cycles can help to uncover key life-history traits, shaping the rate and type of their molecular evolution.

This study was supported by the Russian Federal Academic Leadership Program Priority 2030 at the Immanuel Kant Baltic Federal University.

**References**

1. Bongers T. The Maturity Index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and cp-scaling // *Plant Soil*. 1999. T. 212, № 1. C. 13–22.
2. Konrad A. et al. Mitochondrial mutation rate, spectrum and heteroplasmy in *Caenorhabditis elegans* spontaneous mutation accumulation lines of differing population size // *Mol. Biol. Evol.* 2017. T. 34, № 6. C. 1319–1334.

## ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ НА СТРАЖЕ ЗДОРОВЬЯ МАТЕРИ И ПЛОДА

К. И. Обернихин, Е. В. Енькова

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко*

✉ kirill.obernixin@yandex.ru

### Аннотация

Цифровизация — ключевой вектор развития национального здравоохранения. Внедрение продуктов IT-сферы в здравоохранение идет по таким направлениям, как профилактика, диагностика, дистанционное сопровождение пациентов. В то же время охрана здоровья матери и ребенка, профилактика акушерских осложнений, а также материнской и младенческой смертности — ведущие направления национального проекта «Демография».

### Актуальность

Цифровизация сети лечебно-профилактических учреждений, переход на электронный документооборот, развитие телемедицины — основные цели развития национального проекта «Здравоохранение» [1–3]. Мобильные приложения — один из инструментов цифровизации [4, 5]. С помощью прохождения тестов и опросов, использования шкал и индексов пациенты получают возможность самостоятельно оценить состояние своего здоровья на догоспитальном этапе. Перегруженность амбулаторно-поликлинической службы, недостаточная укомплектованность медицинских учреждений кадрами, низкая доступность медицинской помощи в отдаленных районах определили потребность в развитии системы дистанционного мониторинга за состоянием пациентов [6]. В группах риска по перинатальным осложнениям требуется динамический мониторинг состояния беременной при участии медицинского специалиста. В настоящее время организовать это невозможно, поскольку необходимы как кадровые, так и материально-технические средства. В этом случае внедрение средств искусственного интеллекта, оценивающего состояние здоровья беременной и интерпретирующего жалобы, позволит обеспечить круглосуточное наблюдение за беременными из групп риска.

**Цель работы** — разработать информационный продукт (мобильное приложение), позволяющий беременным женщинам оценивать текущее состояние своего здоровья, а ее лечащему врачу — получать систематизированную информацию о жалобах пациентки. Основные требования: простота интерфейса, возможность автономной работы без доступа к интернету, лаконичный дизайн, соответствие действующим клиническим рекомендациям.

### Материалы и методы

Методом объектно ориентированного программирования в интегрированной среде IDE Java разработано мобильное приложение «Контроль беременности, прогнозирование и предупреждение преждевременных родов». В состав программного пакета вошло 3 блока: «Мое здоровье», «Моя беременность», «Мое психологическое состояние». Шкалы и их интерпретация соответствуют действующим клиническим протоколам Российского общества акушеров гинекологов. Программный продукт прошел процедуру государственной регистрации в Роспатенте (свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ № 2022616616 от 15.04.2022). Приложение внедрено в клиническую практику женской консультации БУЗ ВО «ВГКП № 1» с целью мониторинга течения беременности у женщин из групп риска. Спустя 4 месяца с момента старта клинического тестирования был проведен аудит эффективности и приверженности к использованию. Полученные результаты демонстрируют повышение стремления беременных к самоконтролю и модификации образа жизни, снижение случаев перинатальных осложнений на 10 % ( $p < 0,03$ ).

### Результаты

Мобильное приложение «Контроль беременности, прогнозирование и предупреждение преждевременных родов» позволяет проводить диагностику соматических расстройств, оценивать изменения в течение беременности, модифицировать образ жизни, что в конечном счете приводит к снижению частоты случаев перинатальных осложнений.

### Заключение

Внедрение мобильных приложений в работу женской консультации позволяет значительно повысить показатели доступности и качества оказания медицинской помощи, уменьшить число случаев перинатальных осложнений.

**Литература**

1. mHealth: new horizons for health through mobile technologies: second global survey on eHealth//World Health Organization. Geneva, 2011. URL: [www.who.int/goe/publications/goe\\_mhealth\\_web.pdf](http://www.who.int/goe/publications/goe_mhealth_web.pdf)
2. Safran Naimark J., Madar Z., Shahar D.R. The impact of a Web-based app (eBalance) in promoting healthy lifestyles: randomized controlled trial // J. Med. Internet. Res. 2015. Vol. 17 (3). P. e56.
3. Harricharan M., Gemen R., Celemín L. F. et al. Integrating mobile technology with routine dietetic practice: the case of myPace for weight management // Proc. Nutr. Soc. 2015. Vol. 74 (2). P. 125–9.
4. The Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomized clinical trials // Lancet. 2007. Vol. 369. P. 1861–68.
5. Garland S. M., Kjaer S. K., Muñoz N. et al. Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: A Systematic Review of 10 Years of Real-world Experience // CID. 2016. Vol. 63. P. 519–27.
6. Smith A. U. S. Smartphone Use in 2015. Washington, DC: Pew Internet & American Life Project, 2015.



## ОЦЕНКА УСЛОВИЙ ТРУДА ПЕДАГОГОВ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

А. Д. Павлов

*Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований, Ангарск*

✉ alex\_pav\_med@mail.ru

На педагогов общеобразовательных учреждений оказывают влияния различные вредные факторы во время рабочего процесса, часть из которых не соответствует гигиеническим стандартам. По данным исследований отечественных авторов [1–3], до 90 % педагогов имеют функциональные отклонения в состоянии здоровья. При этом половина учителей считают, что школа негативно повлияла на их здоровье [4]. Большинство учителей отмечают, что главной причиной их заболеваний является профессиональная деятельность [5].

По данным [6–8], условия труда педагогов по показателям вредности и опасности факторов производственной среды оцениваются как допустимые (класс 2), по тяжести трудового процесса — как вредные (тяжелый труд) 1-й степени (класс 3.1). По показателям напряженности трудового процесса условия труда являются вредными и соответствуют классу 3.1–3.2.

Гигиеническая оценка расписаний учебных занятий показала, что основными нарушениями режима образовательного процесса являются: двусменная работа в школах; увеличение ежедневной нагрузки за счет распределения шестидневного учебного плана на пять дней; «окна» как между уроками одного педагога, так и между уроками и внеурочными занятиями (кружок, факультативные занятия, классный час) [9].

Хронометражные исследования рабочего времени 158 педагогов показали, что при 6–7-часовом рабочем дне педагоги находятся в рабочей позе стоя в среднем 77,4 % рабочего времени. Это связано с выполнением рабочих обязанностей, таких как перцептивная, академическая, контрольная, организаторская и коммуникативная функции. Голосовая нагрузка составляет в среднем 221,6 мин: у социальных педагогов — 185 мин, учителей-предметников — 220 мин, учителей начальных классов — 260 мин. По результатам проведенной аттестации рабочих мест педагогов выявлено, что труд учителя соответствует по показателям тяжести трудового процесса (рабочая поза 145 мин стоя) 3-му классу, вредный (тяжелый труд) 1-й степени (3.1); по показателям напряженности — 3-му классу, вредный (напряженный труд) 1-й степени (3.1). Интегральный показатель напряженности труда педагогов общеобразовательных школ находится в пределах от  $L_{нт} = 1,283$  балла (высокая степень напряженности труда) до  $L_{нт} = 1,525$  балла (очень высокая степень напряженности труда) [10]. Каждый из указанных факторов может быть причиной профессионально обусловленных заболеваний: артериальной гипертензии, хронической недостаточности вен нижних конечностей, нарушений опорно-двигательного аппарата [5, 11–13]. Довольно часто встречаются такие нарушения здоровья, как эмоциональное выгорание и психодезадаптационные состояния [14, 15].

Ни один из 130 опрошенных не применял немедикаментозных методов профилактики. В качестве наиболее распространенных аргументов, оправдывающих отсутствие обращения за помощью, указывается страх получения некачественной услуги, риск распространения о себе личной информации и низкий уровень профессионализма доступных специалистов [16].

Таким образом, педагогов общеобразовательных организаций можно отнести к категории работников, подверженных не только профессиональному стрессу, но и воздействию не соответствующих гигиеническим нормативам факторов трудового процесса.

В связи с этим требуется разработка мер первичной и вторичной профилактики неблагоприятного влияния комплекса факторов трудового процесса на состояние физического и психического здоровья педагогов, которые будут лишены недостатков, описанных выше: высокой стоимости, риска распространения личной информации и низкой квалификации. Также необходимы дальнейшие исследования, которые позволят выявить связь между психическими нарушениями у педагогов, развившимися при длительном стаже работы, и их профессиональной деятельностью.

### Литература

1. Пестерева Д. В. Профессиональные факторы риска для здоровья педагогов // Акад. журн. Зап. Сибири. 2020. Т. 16, № 1 (84). С. 18–20.
2. Надеина Л. Е. Анализ профессиональной заболеваемости педагогов // Вестн. Донец. пед. ин-та. 2018. Т. 2. С. 134–140.
3. Ченцова С. Н., Антонова А. А., Сердюков В. Г. Актуальные вопросы изучения и оценки здоровья учителей общеобразовательных школ // Астрахан. мед. журн. 2013. Т. 1. С. 302–306.
4. Осьмук Л. А., Сафронова М. В., Захир Б. С. Психосоциальное благополучие и профессиональная деятельность российских учителей // Идеи и идеалы. 2013. Т. 1, № 3 (17). С. 91–104.

5. Жуков О. Ф., Россошанская Н. С. Профессиональное здоровье учителя // Учен. зап. Ин-та им. П. Ф. Лесгафта. 2011. Т. 3 (73). С. 75–78.
6. Степанов Е. Г., Ларионова Т. К., Галикеева А. Ш., Овсянникова Л. Б. Проблемы сохранения и укрепления здоровья педагогов в современных условиях // Медицина труда и экология человека. 2016. Т. 1. С. 33–39.
7. Горбич В. Ф., Гревцова Е. А., Чукина Г. В. Оптимизация преподавания дисциплины «безопасность жизнедеятельности» в вузе // Современные проблемы безопасности жизнедеятельности: настоящее и будущее. Материалы III Междунар. науч.-практ. конф. в рамках форума «Безопасность и связь». Казань, 2013. С. 114–116.
8. Юшкова О. И., Матюхин В. В., Бухтияров И. В. и др. Методическое обоснование оценки функционального напряжения организма при умственном труде // Вестн. Тверск. гос. ун-та. Сер.: Биология и экология. 2014. Т. 3. С. 15–26.
9. Багнетова Е. А. Здоровье педагога в условиях современной профессиональной среды // Актуальные науч. исслед. в современном мире. 2018. Т. 11–7 (43). С. 174–176.
10. Жеглова А. В., Лапко И. В., Богатырева И. А. Комплексная оценка факторов риска профессионального выгорания педагогов общеобразовательных школ. Анализ риска здоровью // Внешнесредовые, социальные, медицинские и поведенческие аспекты совместно с международной встречей по окружающей среде и здоровью RISE — 2021; Материалы XI Всерос. науч.-практ. конф. Пермь, 2021. С. 142–148.
11. Илькаева Е. Н., Такаев Р. М., Степанов Е. Г. и др. Состояние здоровья учителей по результатам самооценки и дополнительной диспансеризации // Здоровье населения и среда обитания — ЗНИСО. 2009. Т. 1 (90). С. 25–28.
12. Хамедова М. Ш., Серебрякова В. Н., Трубачева И. А., Кавешников В. С. Распространенность отдельных компонентов метаболического синдрома среди педагогов // Сиб. мед. журн. 2013. Т. 3 (27). С. 77–81.
13. Степанов Е. Г., Фасиков Р. М., Диденко Н. А. и др. Труд и здоровье учителей общеобразовательных школ в современных условиях // Медицина труда и промышленная экология. 2010. Т. 6. С. 24–27.
14. Смиренский Е. А. Частота встречаемости пограничных психопатологических расстройств среди педагогов г. Нижнего Новгорода // Тюмен. мед. журн. 2014. Т. 16 (3). С. 49–50.
15. Beames J. R., Christensen H., Werner-Seidler A. School teachers: the forgotten frontline workers of Covid-19 // Australas Psychiatry. 2021. Т. 29 (4). С. 420–422.
16. Багнетова Е. Факторы профессионального стресса педагогов общеобразовательных школ // Вестн. Сургут. гос. пед. ун-та. 2017. Т. 48. С. 84–88.

## ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ГЛИФОСАТА НА ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ\*

Е. С. Пономарева<sup>1</sup>, Г. Ю. Лаптев<sup>1,2</sup>, Л. А. Ильина<sup>1,2</sup>, К. А. Калиткина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный аграрный университет

✉ kate@biotrof.ru

### Аннотация

Глифосат — это широко используемый гербицид. Накапливаясь в выращиваемых культурах, он с кормом попадает в организм птицы и негативно влияет на микробиом кишечника. Секвенирование 16S-rRNA — известный метод анализа для идентификации и сравнения бактерий, присутствующих в изучаемом образце. Для аннотации результатов исследования применялось программное обеспечение QIIME2.

Попадая в организм животного через корм, глифосаты воздействуют на сообщества микроорганизмов-симбионтов кишечника, нарушают баланс и уменьшают содержание полезных бактерий в микробиоте желудочно-кишечного тракта, что может способствовать снижению продуктивности и ухудшению устойчивости птицы к заболеваниям.

Эксперимент проводили на цыплятах-бройлерах, которых разделили на 3 группы: I — контрольная, II — получала рацион с добавлением глифосата (на уровне 1 ПДК); III — получала рацион, глифосат и пробиотическую добавку. В конце эксперимента отбирали пробы содержимого слепых отростков кишечника. Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (*Illumina*), длина полученных последовательностей составила  $2 \times 250$  п. о. Биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения QIIME2 (v. 2022.2), а шумоподавление — методом DADA2, для назначения таксономии использовали базу данных Silva 138.1 (99 % *sequence similarity*).

Результаты исследования показали, что в образцах обнаружено 23 семейства микроорганизмов (см. таблицу). Часть микроорганизмов, по сравнению с контрольной группой, полностью исчезала, а часть, наоборот, появилась при добавлении в корм глифосата. В кишечнике цыплят опытных групп (II, III) с введением глифосата снизилось содержание представителей семейств *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и *Clostridia vadinBB60 group* и пр., которые обладают выраженной целлюлозолитической активностью.

### Содержание некоторых семейств в слепых отростках кишечника бройлеров

Представители семейства	Представленность по группам, % (msd)		
	I группа	II группа	III групп
<i>Acholeplasmataceae</i>	8,35 ± 9,19	12,89 ± 4,12	10,93 ± 3,64
<i>Ruminococcaceae</i>	17,08 ± 1,31	15,56 ± 0,8	10,22 ± 5,99
<i>Oscillospiraceae</i>	26,65 ± 6,5	26,53 ± 6,3	20,19 ± 1,78
<i>Lachnospiraceae</i>	27,06 ± 4,14	16,66 ± 0,62	20,16 ± 6,56
<i>Clostridia vadinBB60</i>	10,69 ± 5,95	9,08 ± 4,65	10,54 ± 5,23
<i>Bacteroidaceae</i>	0,03 ± 0,05	3,52 ± 5,95	15,41 ± 13,56
<i>RF39</i>	0,9 ± 0,84	2,93 ± 3,72	3 ± 4,35
<i>Barnesiellaceae</i>	1,66 ± 2,27	2,34 ± 1,12	0,12 ± 0,2
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,18 ± 2,88	3,06 ± 3,43	1,1 ± 0,57
<i>Eubacterium uncl.</i>	0,19 ± 0,33	2,51 ± 0,83	2,9 ± 1,82
<i>Clostridia UCG-014</i>	1,28 ± 1,3	1,89 ± 1,23	3,62 ± 3,76
<i>Erysipelatoclostridiaceae</i>	1,9 ± 1,14	1,43 ± 0,97	0,6 ± 0,34
<i>Butyricocccaceae</i>	1,3 ± 0,9	0,81 ± 0,88	0,63 ± 0,22
<i>Defluviitaleaceae</i>	0,13 ± 0,22	0,14 ± 0,15	0,28 ± 0,34
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,12 ± 0,2	0,35 ± 0,33	0,15 ± 0,26

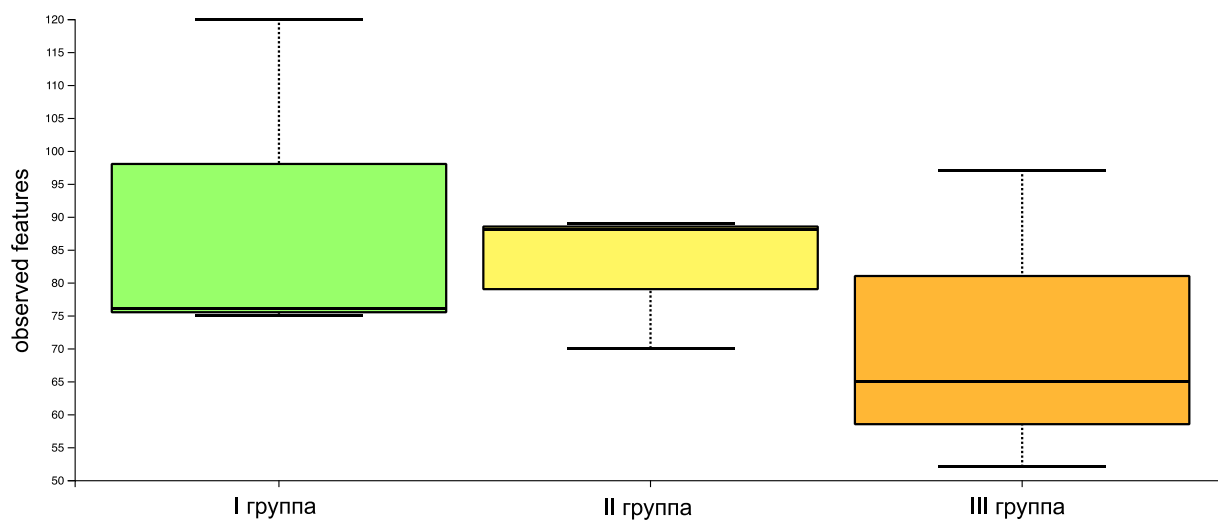
В то же время содержание представителей семейств *Erysipelotrichaceae* и некультивируемых *Acholeplasmataceae* в опытных группах относительно контрольной возросло. Известно, что представителей

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-16-00128.

*Erysipelotrichaceae* связывают с нарушениями обмена веществ и воспалительными заболеваниями в организме хозяина. Однако введение в рацион пробиотической добавки способствовало сдерживанию роста данных микроорганизмов.

Таким образом, глифосат в корме даже на уровне ПДК способен провоцировать дисбактериоз в кишечнике кур и снизить их показатели продуктивности и здоровья.

Благодаря использованию плагинов программного пакета QIIME2 и данных оперативных таксономических единиц (ОТЕ) рассчитан индекс разнообразия и построен график зависимости числа ОТЕ от количества прочтений (см. рисунок). В результате, несмотря на негативное влияние на качественный состав микробиоты, количественный при этом не претерпел значительных изменений.



Значения ОТЕ микробиома кишечника цыплят-бройлеров

## РЕКОНСТРУКЦИЯ И АНАЛИЗ ГЕННОЙ СЕТИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА КЛЕТКИ

П. М. Ревва<sup>1-3</sup>, П. С. Деменков<sup>1,2</sup>, В. А. Иванисенко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

<sup>2</sup> *Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

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

✉ p.revva@g.nsu.ru

### Аннотация

В данной работе с помощью системы ANDSystem проведена реконструкция генных сетей регуляции внешнего пути апоптоза при гепатоцеллюлярной карциноме в условиях механического стресса и дано их описание с использованием шаблонов путей 12 типов. На основе анализа путей найдены белки, которые одновременно задействованы в трех процессах: являются компонентами генной сети ГЦК, сигнального пути ответа на механический стресс и связаны с маркерами рецептор-индуцированного апоптоза.

Ежегодно в мире регистрируется около 700 тыс. случаев гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [1]. ГЦК создает множество проблем при лечении, включая изменчивую морфологию, плохой прогноз, отсутствие проверенных маркеров и методов визуализации [2]. При секвенировании генома клеток рака печени выявлены различные генетические изменения. Их анализ показал, что преобладающими факторами прогрессирования ГЦК являются нарушения, которые связаны с регуляцией экспрессии генов, контролирующих различные стадии клеточного цикла, и блокированием апоптоза [3].

Апоптоз — это контролируемый процесс программируемой клеточной гибели. Выделяют два пути, по которым идет апоптоз: внешний, осуществляемый через поверхностные рецепторы клеточной гибели, и внутренний — через цепь митохондриальных реакций [4]. Индукция апоптоза в раковых клетках является одной из ключевых стратегий терапии рака [5]. Часто рак ингибирует апоптоз, чтобы инициировать свой злокачественный фенотип [6].

Механические сигналы играют важную роль в пролиферации, выживании, дифференцировке и индукции апоптоза. Давление внутритканевой жидкости, возникающее в результате накопления жидкости в растущей опухоли, представляет собой механическую нагрузку на раковую клетку. Механический стресс снижает скорость их пролиферации и вызывает апоптоз [7]. Для роста опухоли в пределах ограниченного пространства, определяемого окружающей тканью, необходимо преодолеть силы сжатия и ингибировать апоптоз.

С помощью системы ANDSystem проведена реконструкция генных сетей регуляции внешнего пути апоптоза при ГЦК в условиях механического стресса и дано их описание с использованием шаблонов путей 12 типов. Анализ проводился вручную с применением данных научной литературы. В ходе исследования выявлены регуляторные молекулярно-генетические пути, включающие от одного до двух посредников между белками, являющимися компонентами генной сети ГЦК, и тремя ключевыми белками апоптоза (FADD, cFLIP, Caspase-8). Среди белков ответа на механический стресс найдены JNK1, CD40, среди белков-посредников — STAT3, ATG5, E-cadherin, TNF, MCL1, p21. Полученные знания могут расширить понимание молекулярно-генетических механизмов регуляции прогрессии гепатомы в условиях механического стресса, что поможет повлиять на тактику разработки лечения пациентов с ГЦК.

### Литература

1. Chernobrovkina T. Y., Yankovskaya Y. D. Hepatocellular Carcinoma. Recent Advances in Diagnosis and Treatment // Arch. Internal Med. 2016. Vol. 1 (27).
2. Gish R. G. Hepatocellular Carcinoma: Overcoming Challenges in Disease Management // Clin. Gastroenterology Hepatology. 2006. Vol. 4. P. 252–261.
3. Guichard C., Amadio G. et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma // Nat. Genet. 2012. Vol. 44 (6). P. 694–698.
4. Vaux D. T. Apoptosis Timeline // Cell Death Diff. 2002. Vol. 9. P. 35–54.
5. Kasibhatla S., Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? // Mol. Cancer Ther. 2003. Vol. 2. P. 573–580.
6. Sun S., Hail N., Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention // J. Natl. Cancer Inst. 2004. Vol. 96 (9). P. 662–72.
7. Voutouri C., Mpekris F. et al. Role of Constitutive Behavior and Tumor-Host Mechanical Interactions in the State of Stress and Growth of Solid Tumors // PLoS ONE. 2014. Vol. 9 (8).

## МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭФФЕКТА МУТАЦИЙ В RBD S-БЕЛКА SARS-COV-2 НА СТАБИЛЬНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ RBD + ACE2 И RBD + АНТИТЕЛО

Г. В. Роев<sup>1,2</sup>, К. Ф. Хафизов<sup>1</sup>, В. Г. Акимкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ roevherman@gmail.com

### Аннотация

В данной работе методом моделирования с помощью классической молекулярной динамики исследовалась стабильность двух белковых комплексов: рецептор-связывающий домен *Spike*-белка (RBD) + ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), а также RBD + нейтрализующее антитело (NAb), при внесении в RBD различных мутаций, характерных для значимых штаммов SARS-CoV-2.

Различные аминокислотные замены, возникающие в RBD, могут приводить к изменению стабильности комплексов RBD + ACE2, RBD + NAb. Моделирование проводилось методом классической молекулярной динамики (МД) для изучения стабильности этих белковых комплексов. В базе данных RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) выбраны структуры с PDB ID: 6LZG (RBD + ACE2) и 6XE1 (RBD + NAb). Из соответствующих им PDB-файлов удалены вода и лиганды. Так как некоторые атомы в аминокислотах были пропущены, PDB-файлы для восстановления обработали программой *Complete structure* в WHAT-IF-сервере (<https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/index.html>).

Отобраны единичные аминокислотные замены в RBD-домене, соответствующие наиболее распространенным вариантам SARS-CoV-2, таким как Альфа, Бета, Дельта, Омикрон (линии BA.1 и BA.2). Полный список замен: D405N, E484A, G446S, G496S, K417N, L452R, N440K, N501Y, Q493R, Q498R, R408S, S477N, T478K, Y505H. Также выбраны комбинации аминокислотных замен, соответствующие этим вариантам вируса, путем построения множественного выравнивания и отбора наиболее характерных мутаций для каждого штамма.

Итоговый список комбинаций мутаций для различных вариантов:

- 1) B.1.351: S:K417N, S:E484K, S:N501Y;
- 2) B.1.1.7: S:N501Y;
- 3) AY.122: S:L452R, S:T478K;
- 4) BA.1: S:G339D, S:S371L, S:S373P, S:S375F, S:K417N, S:N440K, S:G446S, S:S477N, S:T478K, S:E484A, S:Q493R, S:G496S, S:Q498R, S:N501Y, S:Y505H;
- 5) BA.2: S:G339D, S:S373P, S:S375F, S:K417N, S:N440K, S:S477N, S:T478K, S:E484A, S:Q493R, S:Q498R, S:N501Y, S:Y505H, S:D405N, S:R408S, S:S371F, S:T376A.

Комбинации замен и единичные мутации внесены в подготовленный PDB-файл структуры S-RBD + ACE2 с помощью программы UCSF Chimera опцией *Rotamers*. Для структуры S-RBD + Antibody аналогичным образом подготовлены структуры только с комбинациями мутаций. В итоге для S-RBD + ACE2 получилось 19 структур (1 дикий и 18 мутантных типов), для S-RBD + Antibody — 6 структур (1 дикий и 5 мутантных типов).

Для моделирования применялся пакет GROMACS v2021.5, длительность траектории МД — 100 нс каждая. Использовалось силовое поле AMBER99SB-ILDN, форма коробки — *triclinic* (расстояние до стенок 3 нм). Ионы Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> добавлены в концентрации 0,15 моль/л для нейтрализации электрического заряда. Термостат *V-rescale*, температура 300 К, баростат *Parinello-Rahman*, давление 1 бар.

После завершения расчетов для каждой из структур было посчитано RMSD 2 раза: 1) по C-alpha атомам всей системы после структурного выравнивания всех C-alpha атомов на изначальную структуру (1-й способ); 2) по C-alpha атомам S-RBD после структурного выравнивания C-alpha атомов ACE2/NAb на C-alpha атомы в начальной структуре (2-й способ). В табл. 1–4 приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения RMSD, посчитанные двумя способами и соответствующие разным мутациям и комбинациям мутаций, а также дикому типу (WT). Величины упорядочены по убыванию среднего значения слева направо.

Таблица 1

RMSD (1-й способ) для S-RBD + ACE2

	G446S	R408S	S477N	Q493R	G496S	BA2	Beta	N501Y	Y505H	E484A	N440K	L452R	Delta	Q498R	T478K	WT	BA1	D405N	K417N
Average	0,29	0,28	0,26	0,26	0,25	0,25	0,25	0,23	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,20	0,20	0,19
STD	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,03	0,04	0,05	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03

Таблица 2

## RMSD (2-й способ) для S-RBD + ACE2

	G446S	S477N	Beta	Q493R	N501Y	Y505H	Delta	L452R	Q498R	T478K	BA2	BA1	N440K	WT	K417N	R408S	G496S	E484A	D405N
<b>Average</b>	0,72	0,66	0,59	0,58	0,56	0,54	0,51	0,49	0,48	0,46	0,45	0,41	0,40	0,40	0,37	0,37	0,35	0,32	0,31
<b>STD</b>	0,19	0,17	0,18	0,17	0,18	0,17	0,13	0,16	0,14	0,17	0,14	0,11	0,16	0,12	0,13	0,10	0,12	0,09	0,10

Таблица 3

## RMSD (1-й способ) для S-RBD + NAb

	BA1	Alpha	WT	Delta	BA2	Beta
<b>Average</b>	0,46	0,44	0,43	0,42	0,39	0,39
<b>STD</b>	0,12	0,10	0,06	0,09	0,08	0,09

Таблица 4

## RMSD (2-й способ) для S-RBD + NAb

	Alpha	BA1	Delta	Beta	BA2	WT
<b>Averse</b>	1,03	0,99	0,97	0,88	0,82	0,80
<b>STD</b>	0,28	0,33	0,27	0,27	0,24	0,17

Как следует из результатов, комплексы стабильны, но не всегда согласуются с экспериментальными данными. Так, замена N501Y, по экспериментальным данным, является стабилизирующей для комплекса S-RBD + ACE2, а у нас увеличивает RMSD. Однако значение RMSD не всегда корректно отражает эффект мутации на стабильность комплекса, особенно на временном промежутке в десятки наносекунд, в связи с чем в данный момент нами проводятся более точные расчеты энергии связывания двух белков и площади поверхности, доступной для растворителя. Это потенциально позволит эффективно предсказывать свойства новых штаммов вируса вскоре после появления их последовательностей в геномных базах данных.

# КЛАСТЕРИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ H2A\*

Л. Сингх-Пальчевская<sup>1</sup>, А. К. Шайтан<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

<sup>2</sup>Высшая школа экономики, Санкт-Петербург

✉ l.singh@intbio.org

## Аннотация

Гистоновые белки делятся на функционально значимые семейства. В данной работе построено филогенетическое дерево и проанализированы некоторые различия аминокислотных последовательностей между функционально значимыми семействами гистоновых белков класса H2A. Группа гистоновых вариантов, известная как short H2A, выделяется в отдельное подсемейство и демонстрирует очень низкие показатели консервативности внутри себя и с другими гистоновыми вариантами.

Гистоновые белки (H2A, H2B, H3, H4 и H1) — один из ключевых факторов, участвующих в регуляции стабильности и доступности эукариотического генома. Два димера H2A-H2B и тетрамер H3-H4 формируют октамер, вокруг которого оборачивается примерно 147 п. о. ДНК [1]. Большинство гистонов принимают участие в упаковке ДНК в ходе репликации. Другие гистоны, известные как гистоновые варианты, встраиваются в нуклеосому в ходе всего клеточного цикла и обуславливают регуляцию работы определенных участков генома.

Ввиду функционального и видового разнообразия гистоновых вариантов можно выделить отдельные семейства. Например, известный белок CENP-A, или cenH3, необходимый для образования кинетохор, встраивается исключительно в центромерную нуклеосому [2]. Гистоновый вариант H2A.W, специфичный для растений, обнаружен в гетерохроматине [3]. Аминокислотная последовательность различных вариантов может расходиться всего в нескольких остатках или значительно отличаться. Также некоторые гистоновые варианты имеют специфические мотивы и домены, другие хорошо изучены. Однако до сих пор нет достаточного понимания полного разнообразия аминокислотной последовательности и структурных особенностей гистоновых вариантов, влияющих на жизненно важные функции организма.

Для того чтобы охарактеризовать различия аминокислотной последовательности между гистоновыми вариантами H2A, были собраны все последовательности данного типа и построено филогенетическое дерево с использованием ClustalW2 и алгоритма UPGMA в качестве метода кластеризации (рис. 1). Рассмотрена матрица попарной идентичности последовательностей (рис. 2). Видно, что аминокислотные последовательности белков

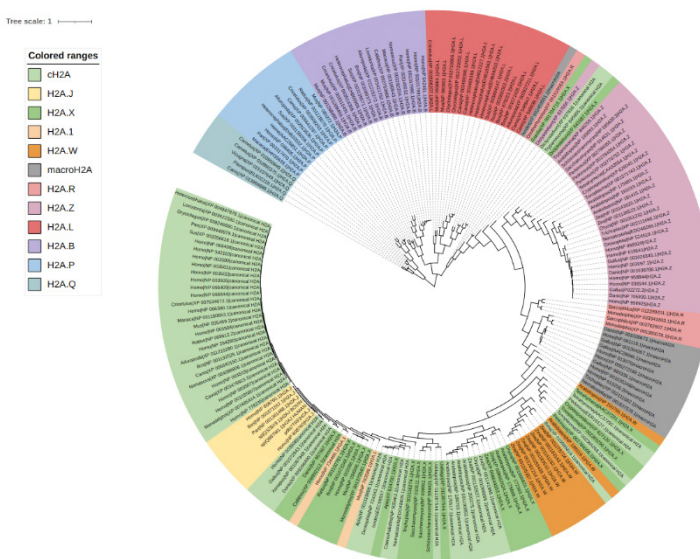


Рис. 1. Филогенетическое дерево функционально значимых семейств H2A

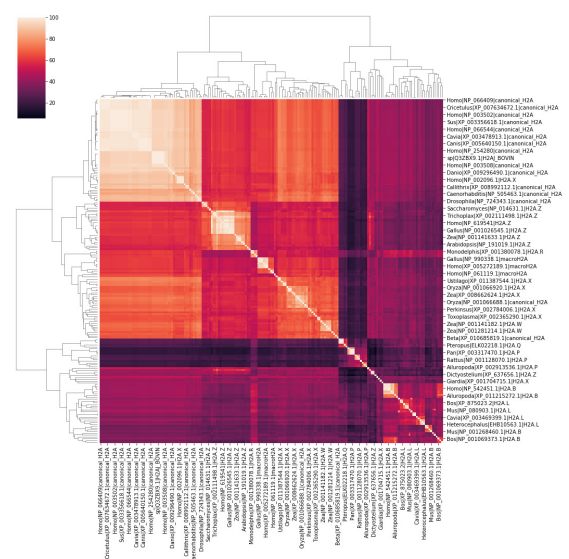


Рис. 2. Матрица попарной идентичности между аминокислотными последовательностями гистона H2A

\* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МД-1131.2022.1.4.



H2A хорошо делятся на два подсемейства. В первое попали наиболее консервативные гистоновые варианты: канонический H2A, H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2A.W, а также недавно обнаруженный H2A.R [4]. Второе подсемейство представляет группу гистоновых вариантов, известных как короткие (short) H2A, и демонстрирует очень низкую консервативность как с другими гистоновыми вариантами, так и внутри себя. Наименее консервативным оказался гистоновый вариант H2A.P.

Построены выравнивания гистонов из группы short H2A (рис. 3), которые демонстрируют низкую идентичность между аминокислотными последовательностями. Выявлено, что все они лишены значительного участка из домена *docking domain*, характерного для всех гистонов H2A, в частности у недавно открытого варианта H2A.Q [4]. Также важным отличием всех коротких H2A является богатый аргинином N-концевой хвост и отсутствие некоторых кислотных остатков в *acidic patch*, который отвечает за стабильность в нуклеосомно-нуклеосомных взаимодействиях. Эти признаки влияют на структурные и функциональные особенности хроматина.

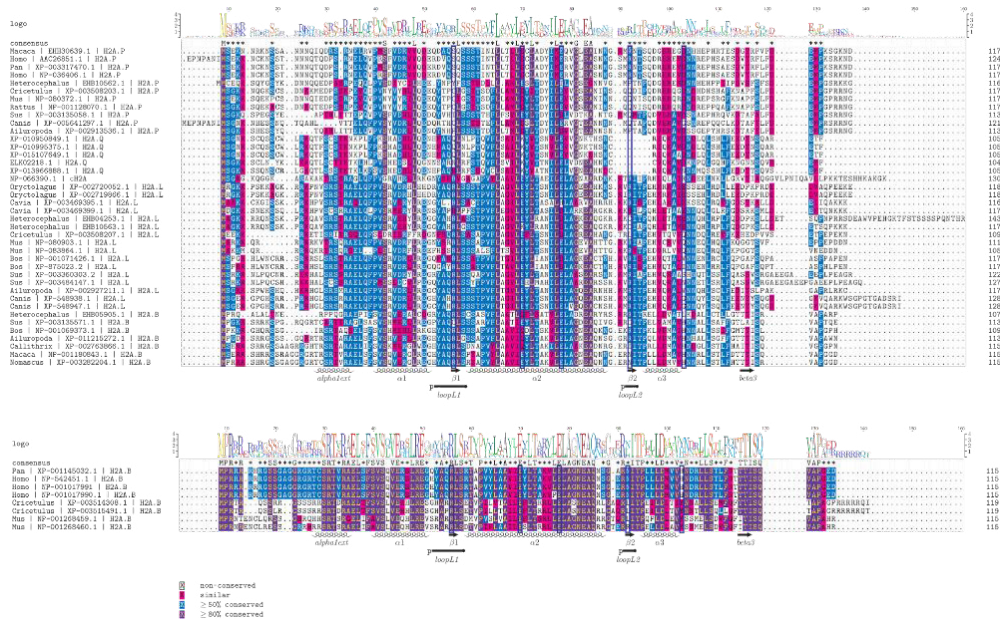


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей short H2A и одной последовательности cH2A

**Литература**

1. Kornberg R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // Sci. 1974. Vol. 184. P. 868–871.
2. Draizen E. J., Shaytan A. K., Mariño-Ramírez L. et al. HistoneDB 2.0: a histone database with variants — an integrated resource to explore histones and their variants // Database. 2016. Vol. 2016, baw014.
3. Yelagandula R., Stroud H., Holec S. et al. The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in Arabidopsis // Cell. 2014. Vol. 158. P. 98–109.
4. Molaro A., Young J. M., Malik H. S. Evolutionary origins and diversification of testis-specific short histone H2A variants in mammals // Genome Res. 2018. Vol. 28.

---

**AN APPLICATION OF SELF-CONSISTENT CLASSIFIER  
TO PREDICT THE INHIBITORS OF CYTOCHROMES P450\***

L. Stolbov, D. Filimonov, V. Poroikov

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

✉ stolbovla@yandex.ru

**Abstract**

The drug discovery process tends to evaluate all biological activities expected from drugs including their possible toxicity and adverse effects. Estimating of the inhibition of cytochrome P450 (CYP) enzyme family is considered as essential toxicological *in silico* assays in order to prevent undesirable adverse effects. Different machine learning approaches are used to facilitate the identification of possible CYP inhibitors; however, no method is recognized as the “standard” one. Thus, the development of new *in silico* approaches is still continuing.

In this study, a novel method for classifying chemical compounds as CYP inhibitors, based on the statistical regularization, is proposed, and validated. The method is based on previously developed self-consistent regression (SCR) [1, 2] which was successfully applied to SAR analysis and quantitative models’ development. SCR is implemented in GUSAR software [3, 4] and based on Multilevel/Quantitative Neighborhood of Atoms (MNA/QNA) molecular descriptors. The main feature of the SCR is the automatic self-consistent selection of molecular descriptors with the best correspondence to the analyzed observable value. The main popular methods for solving classification tasks are based on the Bernoulli trial approach. Based on this and SCR, we have developed a Logistic SCR (LSCR) and Extreme SCR (ESCR), a modification of the LSCR.

To estimate ESCR capabilities, we used EBI ChEMBL [5] as a source of the data on 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4 CYP inhibitors. We divided the inhibitors and non-inhibitors of CYPs by chosen activity cutoff [6]. In 5-fold cross-validation, both SCR and ESCR demonstrated reasonable accuracy of classification. For the test sets, ESCR results are comparable to SCR outcomes in terms of balanced accuracy, and have superior generalizability, which is reflected in a more efficient feature selection and, therefore, uses sufficiently less variables.

**References**

1. Filimonov D. A., Akimov D. V., Poroikov V. V. The Method of Self-Consistent Regression for the Quantitative Analysis of Relationships Between Structure and Properties of Chemicals // *Pharm. Chem. J.* 2004. Vol. 38. P. 21.
2. Lagunin A. A., Zakharov A. V., Filimonov D. A. et al. A new approach to QSAR modelling of acute toxicity // *SAR QSAR Environ. Res.* 2007. Vol. 18. P. 285.
3. Filimonov D. A., Zakharov A. V., Lagunin A. A. et al., QNA-based ‘Star Track’ QSAR approach // *SAR QSAR Environ. Res.* 2009. Vol. 20. P. 679.
4. Zakharov A. V., Peach M. L., Sitzmann M. et al. A New Approach to Radial Basis Function Approximation and Its Application to QSAR // *J. Chem. Inf. Model.* 2014. Vol. 54 (3). P. 713.
5. ChEMBL database. URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (accessed: 24.04.2022).
6. Plonka W., Storka C., Šíchoc M., Kirchmair J. CYPlebrity: Machine learning models for the prediction of inhibitors of cytochrome P450 enzymes // *Bioorg. Med. Chem.* 2021. Vol. 46, № 15.

---

\* This study was supported by the Russian Science Foundation grant № 19 15 00396, <https://rscf.ru/project/19-15-00396>.  
© L. Stolbov, D. Filimonov, V. Poroikov, 2022

## ASSEMBLY AND ANNOTATION OF GENOMES OF ORGANISMS FROM PROTISTA TAXONOMY GROUP BASED ON PARAMECIUM AND NUCLEARIA GENERA

X. V. Sukhanova, A. S. Komissarov\*

*Applied Genomics Laboratory, SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*

✉ [sukhanova@scamt-itmo.ru](mailto:sukhanova@scamt-itmo.ru)

### Abstract

Last decade the development and improvement of next generation and third generation sequencing technologies revealed various opportunities gained through genome assembly: molecular and genetic mechanism establishment, pathogens' identification, gene candidates recognition and broadening biodiversity description [1]. Considering the latter, various genome projects were created: Human Genome Project, 1000 Genomes, 10 thousand Plant Genome Project, etc. However, recent genome projects cover only investigated and described organisms and, consequently, taxonomic groups. Avoiding undescribed and hard or even uncultivated organisms, for instance Protista group, despite its being significantly crucial.

As the majority of described genetic mechanisms such as recombination, cell differentiation, mitotic program were investigated based on *Paramecium* genera from Protista group and its biology, it stands obvious — genome assemblies of Protists are necessary [2–4]. Due to the faced complexities in protists' genome assemblies, recently, the only one protist genome project — Protists 10,000 Genome Project — was established [5], but any data hasn't been obtained yet. In this work we describe main issues encountered during protists' genome assemblies based on two genera: *Paramecium* and *Nuclearia*. Which represents two global problems of protists genomics: uncertain and inaccurate taxonomy in the case of *Paramecium* [6] and hardly possible cultivation of balanced *Nuclearia* culture with the lack of any reference data.

As for the first issue, we identified that recently available genomic data of *Paramecium* spp. could be assembled only into low-quality scaffolds according to QUAST and BUSCO analysis. With graph-based algorithms we also analyzed the synteny of genomes and did phylogeny reconstruction for *Paramecium*. We recognised that mitochondrion and macronucleus genome evolved differently. And phylogeny based on mitochondrion data differs from the one obtained with the macronucleus genome. Thus, both genomes should be taken into account for the reliable and detailed taxonomy reconstruction of *Paramecium* genera.

In the sense of cultivation problem, we made sure of the drastic dependence of the possibility to assemble the genome on raw data, especially in the case of hardly described organisms. With several attempts of *Nuclearia* spp. genomes assembly, we revealed three main limitations: 1) protists sample reflects metagenomic data and should be filtered accurately from contaminations before library preparation; 2) amplification methods of data accumulation (MDA, PCR) increases chimerism of assembled data and lead to the prevalence of misassembly without proper sample filtration; 3) the proportion of DNA of targeted organism could be too low for genome size prediction, k-mer binning, making challenging DNA separation in the case of metagenomic data.

We suppose that the usage of hybrid data and sorption-based methods of DNA accumulation could improve gaining assemblies' qualities. And further data assembly and annotation for *Paramecium* spp. and *Nuclearia* spp. would be achieved.

### References

1. Blaxter M., Archibald J. M., Childers A. K. et al. Why sequence all eukaryotes? // Proc. National Acad. Sci. USA. 2022. Vol. 119 (4). URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.2115636118>
2. Heck M., Neely B.A. Proteomics in Non-model Organisms: A New Analytical Frontier // J. Proteome Res. 2020. Vol. 19, is. 9. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00448>
3. Sebé-Pedrós A., Degnan B. M., Ruiz-Trillo I. The origin of Metazoa: A unicellular perspective // Nature Rev. Genetics. 2017. Vol. 18, is. 8. URL: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.21>
4. Sibbald S. J., Archibald J.M. More protist genomes needed // Nature Ecol. Evol. 2017. Vol. 1, is. 5. URL: <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0145>
5. Miao W., Song L., Ba S. et al. Protist 10,000 Genomes Project // Innovation. 2020. Vol. 1 (3). URL: <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100058>.
6. Johri P., Krenek S., Marinov G. K. et al. Population Genomics of *Paramecium* Species // Mol. Biol. Evol. 2017. Vol. 34 (5). URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx074>

**DISCOVERY OF SOMATIC RECOMBINATION EVENTS IN APP AND ANALYSIS OF ITS OCCURRENCE**X. V. Sukhanova<sup>1</sup>, L. G. Danilov<sup>1,2</sup>, A. S. Komissarov<sup>1</sup><sup>1</sup>*Applied Genomics Laboratory, SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*<sup>2</sup>*Department of Genetics and Biotechnology, St Petersburg State University*

✉ sukhanova@scamt-itmo.ru

**Abstract**

Proteinopathies — are diseases, caused by protein misfolding and loss of function. Among which neurodegeneration is one of the most severe. Which, particularly, is developed after protein misfolding into a specific amyloid structure and following aggregation and loss of function. Amyloid structure represents a cross- $\beta$ -structure with extremely stable and resistant features. Several proteins are known to cause neurodegeneration, from which amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) is the most crucial. Despite the urgency of disease, recently developed diagnostic and therapy systems have low effectiveness. Which are mostly based on already identified genetic markers — mutations in specific proteins-coding genes: amyloid precursor protein (APP), presenelin 1, presenelin 2. However even lying in the protein misfolding processes and following aggregation and amyloidization, these systems do not possess high specificity.

Recently, a new mechanism of APP amyloidization and, thus neurodegeneration development, was proposed [1, 2]. It was shown that neurodegeneration might happen under an event called somatic recombination. Described as being responsible for antibody variation production and immune system reactivity, this mechanism is contributed by abnormal exon-exon recombination of specific V, D and J segments, leading to the formation of non-canonical splice variants. But in the case of APP the exact mechanism and recombination positions have not been designated yet. In this work we created a new algorithm for somatic recombination searching and provided hypotheses of possible mechanisms.

We screened open-access whole genome sequencing data of human brain (SRR7905480 ID) for all possible paired exon-exon combinations of APP gene. This step was contributed after preliminary filtration of raw data with 23-mers generated from APP sequences. Then the alignment of combinations on the filtered genome by BWA algorithm was implemented. From gained overlappings only those with the highest coverage were taken into the next analysis. With obtained coordinates the insertion regions were determined. For verification and annotation each insertion was analyzed on correlation with structural genomic elements, which was taken from annotation data. The latter was based on coordinates intersection as the method. For each insertion the area up and down within ~100 bp was also searched for. Gained distributions then were compared with Kolmogorov-Smirnov test to define significant correlations, including the domain information of  $A\beta$  protein from PDB database.

We established that, indeed, amyloid precursor protein can be affected by somatic gene recombination events in the human genome. However, only 5 % of all possible pairwise exons combinations have a high raw reads coverage. Nevertheless, from those 5 % combinations of exon 7 with exons 6, 9 and 10 appeared to be the most frequent. We also identified that all recombinations were spread through the whole genome of chromosome 21 with a tendency to the start of the APP gene. Finally, the correlation analysis between insertion positions distribution and structural genome elements revealed the association between recombination insertions and following structural elements as: VDJ-segments, recombination patterns and mobile genetic elements. Particular, mobile genetic elements showed the negative correlation trend.

Based on these findings, we proposed that indeed somatic gene recombination exists in the case of APP gene. And the whole genome of chromosome 21 is affected by APP exons recombinations. The most recombinant exon 7 could possess a sufficient role in recombination events and even disease development. And these events could be caused by sided VDJ-segment recombinations and mobile genetic elements transposition.

**References**

1. Kaeser G. E., Chun J. Mosaic Somatic Gene Recombination as a Potentially Unifying Hypothesis for Alzheimer's Disease // *Frontiers Genetics*. 2020. Vol. 11.
2. Mig-Hsiang L., Siddoway B., Kaeser G. E. et al. Somatic APP gene recombination in Alzheimer's disease and normal neurons // *Nature*. 2018. Vol. 563 (7733).

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА МИКРОЯДЕР ЛИМФОЦИТОВ

П. О. Хоменко<sup>1</sup>, Ю. Р. Ахмадуллина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Челябинский государственный университет

<sup>2</sup> Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск

✉ polinahomenko@mail.ru

### Аннотация

Метод кластерного анализа широко применяется в различных дисциплинах и позволяет объединять множество объектов в группы на основе выбранных исследователем алгоритмов сходства или различия. В настоящей работе кластерный анализ использовался для поиска в микроядрах лимфоцитов человека хромосом, часто встречающихся совместно, с целью изучения механизмов элиминации хромосом и их взаимного расположения в ядре.

Кластерный анализ (КА) представляет собой особый метод группировки объектов, задача которого — на основании полученных об объектах данных разбить их множество на подмножества. Данный метод широко применяется в биологии и других дисциплинах с целью объединения схожих объектов из массива данных в группы. Однако при использовании КА необходим индивидуальный подход к каждому набору данных в связи с разнообразием алгоритмов кластеризации. Данный метод позволяет наметить тенденции и предположить наличие сходства или различий между группируемыми объектами, что требуется для понимания изучаемых процессов и выдвижения гипотез [1].

В настоящей работе при помощи КА оценена совместная встречаемость хромосом в микроядрах лимфоцитов периферической крови. Микроядра являются внеядерными хромосомными образованиями, куда попадают хромосомы в результате жизнедеятельности клетки (в процессе нормального протекания клеточного цикла или при повреждении ДНК). Эти данные позволят расширить знания об укладке хромосом в ядре и дополнить информацию о механизмах образования микроядер.

### Материалы и методы

Работа проводилась на лимфоцитах периферической крови (ЛПК) 6 женщин. Для изучения состава микроядер использован стандартный микроядерный тест со стимуляцией лимфоцитов ФГА и добавлением цитохалазина Б для остановки цитокинеза [2].

Препараты окрашивали методом мультицветной флуоресцентной *in situ* гибридизации (mFISH), протокол которого был разработан в соответствии с инструкцией производителя зондов (*MetaSystems Probes*). На препаратах находили лимфоциты с микроядрами, с помощью программного обеспечения Isis (*MetaSystems*) идентифицировали хромосомы в каждом микроядре.

Кластерный анализ проводился в программной среде R при помощи пакетов *ape* и *vegan*. В качестве алгоритма кластеризации выбран метод присоединения ближайшего соседа с индексом сходства Раупа — Крика. В нашем случае он рассчитывается с использованием рандомизационной процедуры Монте-Карло на основе сравнения наблюдаемого числа случаев совместного присутствия хромосом в микроядрах с распределением их совместной встречаемости в 1000 случайным образом сгенерированных выборках [3].

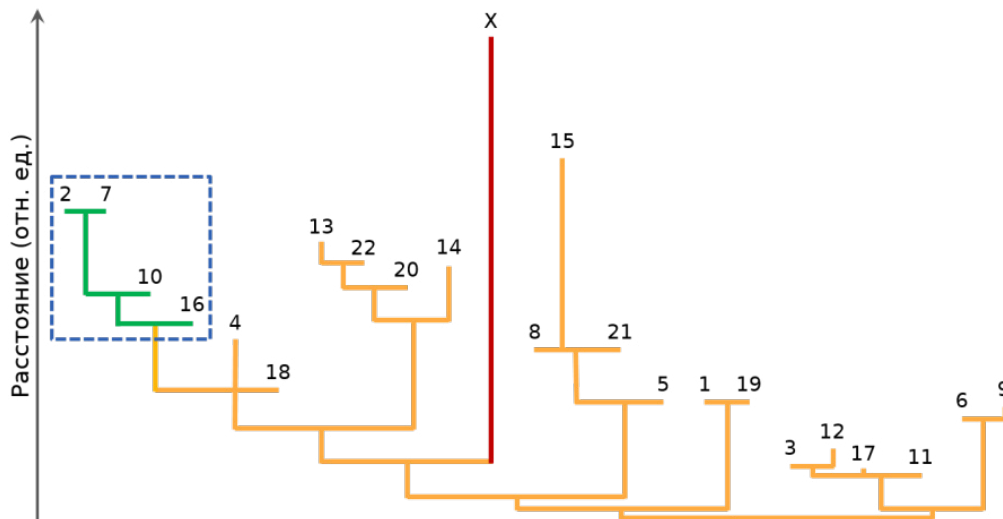
### Результаты

На рисунке представлены кластеры хромосом согласно полученным данным о их совместной встречаемости в 748 микроядрах. Для каждой из пар хромосом был рассчитан индекс сходства Раупа — Крика ( $C_{R-C}$ ) и статистическая значимость вычислялась по формуле  $1 - C_{R-C}$ . Пары хромосом, имеющие статистическую значимость  $p \geq 0,05$  и совместный кластер, сравнивались с данными 3D-моделирования расположения хромосом в ядре ЛПК человека [4].

Согласно полученным данным, хромосомы № 2 и № 7 ( $C_{R-C} = 0,998$ ,  $p = 0,01$ ), № 6 и № 9 ( $C_{R-C} = 0,99$ ,  $p = 0,007$ ), № 1 и № 19 ( $C_{R-C} = 0,99$ ,  $p = 0,003$ ), № 17 и № 11 ( $C_{R-C} = 0,99$ ,  $p = 0,005$ ) статистически значимо встречаются вместе в исследуемых микроядрах, но не располагаются рядом согласно данным о их взаимном расположении в ядре.

Хромосомы № 2 и № 10 ( $C_{R-C} = 0,95$ ,  $p = 0,05$ ), № 7 и № 16 ( $C_{R-C} = 0,99$ ,  $p = 0,01$ ) в микроядрах встречаются вместе статистически значимо часто и располагаются рядом в ядре согласно данным карты хромосом. Однако расстояние между ними, полученное при кластерном анализе, несколько дальше.

Таким образом, кластерный анализ позволяет выявить хромосомы, часто встречающиеся совместно в микроядрах из массива данных. Полученные результаты указывают на то, что хромосомы, попадающие в микроядра, не всегда расположены по соседству в интерфазном ядре. Механизмы совместной элиминации хромосом в микроядра требуют дальнейшего изучения.



Кластерный анализ данных о совместной встречаемости хромосом в микроядрах лимфоцитов периферической крови (цифрами указаны номера хромосом согласно их цитогенетической классификации)

#### Литература

1. Romesburg C. Cluster analysis for researchers // Lulu. Com. 2004.
2. Ахмадулина Ю. Р. Изучение возрастной зависимости спонтанной частоты лимфоцитов с микроядрами у жителей Южного Урала // Соц.-эколог. технологии. 2021. Т. 11, № 2. С. 230–245.
3. Chase J. M. et al. Using null models to disentangle variation in community dissimilarity from variation in  $\alpha$ -diversity // Ecosphere. 2011. Т. 2, № 2. С. 1–11.
4. Sajid A. et al. Ultra-Structural Imaging Provides 3D Organization of 46 Chromosomes of a Human Lymphocyte Prophase Nucleus // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22, № 11. С. 5987.

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ФАРМОКИНЕТИКИ И СХОДСТВА С ЛЕКАРСТВАМИ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЭФИРНОГО МАСЛА *ARTEMISIA ABSINTIUM*

И. С. Черней

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

✉ semitcko.i@yandex.ru

### Аннотация

Данный обзор представлен для ознакомления с бесплатным веб-ресурсом SwissADME, который позволяет вычислять физико-химические свойства, прогнозировать фармакокинетические параметры, лекарственную природу и совместимость с медицинской химией одной или нескольких малых молекул.

Эфирное масло — источник различных групп биологически активных соединений, обладающих фармакологическим эффектом. Количество компонентов в эфирном масле сильно варьируется (от 10 до 170 компонентов), из-за чего не всегда возможно определить их эффективность в качестве лекарственного препарата.

Для подбора потенциальных лекарственных компонентов появились методы тестирования *in silico*, в частности скрининг на основе ядерно-магнитного резонанса, фармакофорный анализ, виртуальный скрининг, тотальный докинг, методы хемо- и биоинформатики [1].

На основе результатов предыдущих работ определены основные компоненты эфирного масла полыни горькой: мирцен ( $17,51 \pm 1,01$  %), сабинен ( $10,31 \pm 1,26$  %), сабинил ацетат ( $9,79 \pm 2,21$  %),  $\beta$ -туйон ( $4,09 \pm 1,27$  %), кариофиллен ( $3,07 \pm 0,15$  %), линалоол ( $2,67 \pm 0,45$  %) [2]. Данные компоненты проанализированы методом виртуального скрининга с использованием бесплатного веб-инструмента SwissADME [3]. Проводился анализ физико-химических свойств молекул по следующим критериям: липофильность, размер, полярность, растворимость в воде (см. таблицу).

### Физико-химические свойства основных молекул эфирного масла *Artemisia absintium*

Название компонента	Липофильность XLOGP3 (от -0,7 до +5)	Размер (150–500 г/моль)	Полярность (TPSA 20-130 Å <sup>2</sup> )	Растворимость (log S не выше 6)
Мирцен	4,17	136,23	0	-3,05
Сабинен	3,09	136,23	0	-2,57
Сабинил ацетат	2,36	194,27	26,30	-2,33
$\beta$ -туйон	2,27	152,23	17,07	-2,15
Кариофиллен	4,38	204,35	0	-3,87
Линалоол	2,97	154,25	20,23	-2,40

Все молекулы являются липофильными и растворимыми в воде. Сабинил ацетат и линалоол обладают значимой полярностью. Мирцен и сабинен имеют маленький размер молекулы, что ограничивает их использование.

При оценке фармакокинетики один из критериев — коэффициент проницаемости кожи (log Kp): чем отрицательнее значение логарифма, тем менее проникающей через кожу является молекула. Все компоненты слабо проницаемы через кожу, а сабинил ацетат и  $\beta$ -туйон наименее проницаемы, в сравнении с другими компонентами (-5,81 и -5,62 см/ч соответственно).

Взаимодействие молекул с цитохромами P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) — один из фармакокинетических параметров. Ингибирование этих изоферментов приводит к токсическим и нежелательным побочным эффектам. Основные компоненты, присутствующие в эфирном масле полыни горькой, не являются ингибиторами описанных выше изоферментов.

Таким образом, ресурс SwissADME предоставляет необходимую информацию для оценки физико-химических свойств и фармакокинетического профиля малых молекул. Согласно полученным данным, оценка основных компонентов эфирного масла полыни горькой показала их перспективность в дальнейших работах.

### Литература

1. Головки Ю. С., Ивашкевич О. А., Головки А. С. Современные методы поиска новых лекарственных средств // Вестн. БГУ. 2021. № 1. Сер. 2. С. 7–15.
2. Семитко И. С. и др. Влияние эфирных масел *Artemisia absinthium* и *Humulus lupulus* на динамику митохондриального мембранного потенциала клеток *S. cerevisiae* // Сб. науч. тр. М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2021. С. 465–473.
3. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules // Sci. Rep. 2017. № 7.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОТЕОФОРМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛГОРИТМА TWISTER ДЛЯ DE NOVO СЕКВЕНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

А. М. А. Шошмина<sup>1</sup>, К. В. Вяткина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет им. Ж. И. Алфёрова РАН

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

✉ a.m.shoshmina@gmail.com

### Аннотация

В данной работе представлен анализ данных, полученных при помощи алгоритма Twister [1, 2], и сравнение их с референсными значениями.

Идентификация протеоформ — актуальная и важная задача, возникающая при исследовании белков. Особое значение данный вопрос имеет при анализе гистонов, так как они в высокой степени подвержены посттрансляционным модификациям.

Входными данными для этого исследования были белки-гистоны типа H2A, H2B, H3, H4 растения *Sorghum bicolor*, полученные в Тихоокеанской северо-западной национальной лаборатории (*Pacific Northwest National Laboratory*) [3]. Материал снят методом *top-down*, с фрагментацией ECD (*Electron-Capture Dissociation* — диссоциация с захватом электрона) [4] на приборе *Thermo Orbitrap*.

В ходе исследования данные сравнивались с референсными последовательностями, найдены модификации и замены. Из 17 белков-гистонов детектированы 14. Также произведен анализ фрагментов, не выровненных на референс. Эти фрагменты — остатки от предыдущих экспериментов. Возникновение таких фрагментов — следствие особенности проведения эксперимента, а алгоритм Twister оказался достаточно чувствительным, чтобы детектировать их. Все фрагменты сопоставлены с белками различных растений и животных, в основном с 60S рибосомам и гистонам кукурузы (*Zea mays*). В общей сложности в образце выявлено приблизительно 100 белков и пептидов.

Поскольку гистоны — белки, подверженные посттрансляционным модификациям, нельзя утверждать, что их модификации не являются белками других организмов. Таким образом, алгоритм Twister подходит для *de novo* секвенирования.

### Литература

1. Vyatkina K., Wu Si, Dekker L. J. M. et al. De Novo Sequencing of Peptides from Top-Down Tandem Mass Spectra // *J. Proteome Res.* 2015. Vol. 14 (11). P. 4450–4462.
2. Vyatkina K., Wu Si, Dekker L. J. M. et al. Top-down analysis of protein samples by de novo sequencing techniques // *Bioinformatics.* 2016.
3. Zhou M., Abdali S. H., Dilworth D. et al. Isolation of Histone from Sorghum Leaf Tissue for Top Down Mass Spectrometry Profiling of Potential Epigenetic Markers // *J. Vis. Exp.* 2021. Vol. 169. P. e61707.
4. Zubarev R. A., Kelleher N. L., McLafferty F.W. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120 (13). P. 3265–3266.



## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММ ПРИ АНАЛИЗЕ ИШЕМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕРДЦА

Б. О. Щеглов

*Дальневосточный федеральный университет, Школа медицины, Владивосток*

✉ b.shcheglov@mail.ru

### Аннотация

Ишемия сердца — один из основных патофизиологических компонентов, сопровождающих болезни (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда), связанные с изменением коронарных артерий и миокарда как субстрата данного состояния. Одним из главных методов диагностики данного состояния, наряду с клинической симптоматикой, является проведение электрокардиографических (ЭКГ) обследований. Проблема применения данного метода обусловлена протеканием ишемии как с элевацией ST-сегмента электрокардиограммы, так и без нее. Рассмотрен вопрос об использовании различных алгоритмов машинного обучения в их диагностике. Представлена методика определения и имплементация данных алгоритмов при оценке ЭКГ-изменений миокарда, связанных с патологией.

**Цель работы** — разработка компьютерных математических моделей функционирования сердца при ишемической болезни на основе данных ЭКГ с помощью методов машинного обучения.

### Материалы и методы

Компьютерное моделирование *in silico* сердечно-сосудистой системы в норме и при патологиях может стать важным дополнением к клиническим и экспериментальным исследованиям в вопросах системного понимания патофизиологического функционирования с возможностью профилактики и разработки новых методов лечения заболеваний сердца. Исследуемый датасет РТВ-ХЛ взят из открытых интернет-источников. Имеющиеся оцифрованные записи ЭКГ были согласованы с Миннесотский кодом, и значения частей ЭКГ вынесены в сводную таблицу. Приведение данных к аппроксимации проводилось с помощью моделей линейной регрессии, стохастического градиентного бустинга, деревьев решений и случайного леса.

### Результаты

Ишемия вызывает укорочение потенциала действия и замедление проводимости. Следовательно, ишемизированный миокард оказывает отчетливое и значимое влияние на распространение и реполяризацию возбуждения в зависимости от интрамуральной протяженности ишемической области. Для трансмуральных и субэндокардиальных ишемических областей наблюдались элевация и депрессия сегмента ST, тогда как промежуточные ишемические области были электрически нейтральными. Разработаны модели на основе следующих алгоритмов: многофакторная логистическая регрессия, случайный лес, стохастический градиентный бустинг и искусственная нейронная сеть. Оценка метрик качества моделей проводилась по следующим параметрам: чувствительность (Sen), специфичность (Spec) и площадь под кривой (AUC). Установлено, что комбинация бинаризованных и непрерывных данных частей ЭКГ давала в большинстве моделей наилучшие метрики точности.

### Выводы

Моделирование *in silico* способствует количественному и механистическому пониманию фундаментальных аритмогенных механизмов ишемии. Более того, компьютерное моделирование может помочь перевести экспериментальные данные на клеточный уровень в контексте электрофизиологии сердца (например, ЭКГ), тем самым обеспечивая полное понимание этого рутинно используемого диагностического инструмента, который может быть преобразован в оптимизированные приложения для профилактики и мониторинга патологий сердца. Полученные результаты подтверждают и дополняют имеющиеся фундаментальные медицинские понятия о патофизиологии протекания ишемической болезни сердца у пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование, и требуют дальнейшей валидации и рассмотрения на дополнительных наборах данных.

## ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНОГО РЕШЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО АДЬЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С. А. Щербакова<sup>1</sup>, И. В. Евгенов<sup>1</sup>, Д. С. Командин<sup>1</sup>, С. Д. Шарков<sup>1</sup>, А. А. Ермоленко<sup>2</sup>, Д. В. Цейликман<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

✉ s.shsherbakova@g.nsu.ru

### Аннотация

В Российской Федерации молочная железа является одной из основных локализаций злокачественных опухолей у женщин, а показатели заболеваемости и смертности возрастают. Нами созданы модели машинного обучения для дальнейшего создания системы поддержки принятия врачебного решения относительно адьювантной терапии РМЖ, определяющие молекулярно-генетический подтип рака молочной железы и использующие вероятностно-ориентированные графы.

Рак молочной железы — наиболее часто выявляемое онкологическое заболевание среди женщин в России. В послеоперационный период врачи-онкологи назначают адьювантную терапию на основании данных иммуногистохимического анализа, в то же время его типирование ограничено 4 типами по классификации Санкт-Галленской конференции 2014 года, также существует технология *microArray* real-time PCR, позволяющая одновременно получать данные об экспрессии относительно большого количества генов с большей информативностью анализа при той же инвазивности. Для использования данных технологий необходимо более совершенное молекулярно-генетическое типирование, анализ опухоли на который производится в частной практике путем либо индексации обработки генов (*OncoType DX*), либо кластеризации (*MammaPrint*). Благодаря машинному обучению будет улучшена производительность, поскольку ML является хорошим способом обработки данных с поиском неявных зависимостей функциональных особенностей опухоли, таким образом повышается точность прогнозов по сравнению с привычными статистическими методами.

Модель машинного обучения разработана с применением классификационных методов обучения с учителем, таких как SVM, Random Forest, LightGBM, Logistic Regression на датасете GWAS-MAP, сформированного из генов (набор параметров) и соответствующего молекулярного типа рака (целевая переменная). Также использовались методы глубокого обучения, а именно одномерной сверточной нейросети (*Artificial Neural Network*), что было эффективно, поскольку задача оказалась нелинейно разделимой. Благодаря предоставленной базе данных для хранения и быстрого доступа к результатам полногеномных ассоциаций GWAS-MAP получены клинические данные для обучения модели. Валидация модели проходила с помощью метрик ROC-AUC, F1-score, Recall-Score на данных, не использованных для обучения. Результат будет улучшаться путем применения Grid Search, Cross Validation, Regularization, а также выявления и внедрения в модель полезных для задачи признаков через проведение медицинских исследований.

На вход модели ML будут подаваться данные по экспрессируемым микроРНК, полученные с микрочипов, разрабатываемых в ходе клинико-лабораторных исследований, и сопоставляться с моделью с комплементарными мРНК-онкомаркерами с помощью вероятностно-ориентированного графа и использования базы данных *mirDIP*, выбирая пороговый *Integration Rate*  $\geq 0,4$ . В микрочип вошли гены, клинически рекомендованные как онкомаркеры рака молочной железы, а также отсортированные по шумности гены-кандидаты.

Механизм работы с прототипом платформы состоит в том, что данные по исследуемым генам получают с помощью микрочипового метода и выделения микроРНК, затем они подаются на вход обученной модели. Далее, используя гены и данные анамнеза (индекс массы тела, возраст и т. д.) в качестве признаков переменных, модель определяет вероятность успешного отклика на химиотерапию (ремиссия и пятилетняя выживаемость) в соответствии с молекулярно-генетическим типированием и поражением лимфоузлов.

Окончательная проверка разрабатываемой платформы будет производиться непосредственно в ходе клинической апробации.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ПЕРЕНОСА МОЛЕКУЛЫ ДИОКСАДЭТА ЧЕРЕЗ ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Е. А. Якуш, А. В. Ким

*Новосибирский государственный университет  
Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*

✉ elenayakush43@gmail.com

### Аннотация

Данная работа посвящена исследованию механизма пассивной диффузии лекарственного препарата «Диоксадэт» через липидный бислой, для чего были проведены молекулярно-динамические расчеты, при помощи которых получены профили свободной энергии переноса лекарственной молекулы через бислой, а также проницаемость.

В конце 1980-х гг. в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова был разработан российский препарат из группы этилениминов. В экспериментальных исследованиях, проведенных с использованием широкого спектра трансплантированных опухолей, он показал значительную резорбтивную и контактную активность. Препарат прошел полный цикл доклинических и клинических испытаний и был одобрен для медицинского применения под названием «Диоксадэт». Он является функциональным аналогом цисплатина и обладает сопоставимой эффективностью и меньшим количеством побочных эффектов. Для уточнения механизма проникновения этого лекарственного средства в клетки организма проведены исследования методами молекулярной динамики, включающие расчеты профиля свободной энергии Гиббса переноса молекулы через липидный бислой, взятый в качестве модели клеточной мембраны, и профиля проницаемости.

Для подобных расчетов необходимы несколько подготовительных стадий, которые были проведены ранее. Во-первых, создание модели на основе квантовых расчетов электронной плотности; во-вторых, расчеты свободной энергии Гиббса растворения в воде, подтвердившие экспериментальные данные; в-третьих, исследование характерного поведения молекул в воде. В результате было создано несколько моделей, для каждой из которых были выполнены упомянутые выше расчеты, подтвердившие хорошую растворимость диоксадэта в воде и позволившие сделать вывод об ассоциации нескольких молекул и причинах такого поведения.

Для изучения механизма переноса через клеточные мембраны использован липидный бислой, составленный из молекул DOPC. Расчеты профиля свободной энергии Гиббса переноса через мембрану проведены для двух крайних созданных нами моделей, нескольких различных температур и двух молекул одновременно: находящейся внутри мембраны и проходящей сквозь нее. Показано, что внутри мембраны находится выгоднее, чем в воде; чаще всего молекула диоксадэта располагается вблизи «голов» липидов, что объясняется электростатическим взаимодействием заряженных частей двух молекул. Наблюдается небольшой энергетический барьер в центральной части мембраны в области разреженных хвостов. В большей степени переносу препятствует поверхность мембраны, что видно на профиле сопротивляемости. Проницаемость мембраны является достаточно высокой и составляет при  $T = 300$  К. Из трех профилей, рассчитанных при разных температурах, получены профили энтальпии и энтропии. Энтальпийный вклад оказывает решающее значение на процесс переноса и делает его выгодным, несмотря на проигрыш в энтропии. Наличие второй молекулы внутри мембраны понижает барьер на поверхности и тем самым увеличивает проницаемость мембраны практически в два раза.

## СРАВНЕНИЕ NGS-ПЛАТФОРМ ILLUMINA NEXTSEQ 2000 И GENEMIND GENOLAB M НА ПРИМЕРЕ БИБЛИОТЕК 10X GENOMICS VISIUM\*

П. С. Ямщиков<sup>1,2</sup>, И. В. Ларионова<sup>1,2</sup>, Ф. А. Кошкин<sup>3</sup>, Д. В. Пьянков<sup>3</sup>, Е. В. Денисов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Томский государственный университет

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт онкологии

Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

<sup>3</sup> Медико-генетический центр «Геномед», Москва

✉ mriamshchikovpavel@gmail.com

### Аннотация

Методы NGS остаются главными в массовом параллельном секвенировании. Методы пространственного полнотранскриптомного профилирования срезов тканей набирают популярность. Стандартом NGS являются платформы компании Illumina. Однако Genolab M от компании GeneMind позволяет решать те же задачи с меньшими затратами, что делает технологию NGS более доступной. В данной работе проведено сравнение платформ NextSeq 2000 и Genolab M на примере библиотек 10x Genomics Visium.

Секвенирование второго поколения (NGS) остается основным решением большинства современных задач в области секвенирования. К таким задачам относится и пространственное полнотранскриптомное профилирование срезов тканей [1], которое можно решить с помощью технологии 10x Genomics Visium. «Золотым стандартом» для секвенирования NGS-библиотек, в том числе и библиотек Visium, являются секвенаторы Illumina [2]. С расширением рынка NGS появилась платформа Genolab M от компании GeneMind, которая по заявленным характеристикам позволяет решать те же задачи, но с меньшими финансовыми затратами. Уже проводилось сравнение результатов секвенирования платформ от GeneMind и Illumina [3], где было продемонстрировано близкое качество результатов. Однако подобного сравнения не было для таких трудоемких библиотек, как Visium от 10x Genomics.

В качестве материала исследования использовали парафиновые блоки опухолей яичников. Материал был собран на базе клиники НИИ онкологии Томского НИМЦ. Исследование проведено в соответствии с местным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Подготовленные библиотеки 10x Genomics Visium секвенировали на приборах Illumina NextSeq 2000 и GeneMind Genolab M. Первичная обработка данных осуществлялась в Space Ranger. Далее при помощи программного пакета Seurat и среды R провели последующий анализ и сравнили полученные результаты между исследуемыми NGS-платформами.

При сравнении качества прошедшего секвенирования выявлено, что NextSeq 2000 обладает незначительным преимуществом в качестве прочтений, тогда как Genolab M, несмотря на меньшую глубину секвенирования, имеет большее количество обнаруженных генов и UMI. У профиля GC-состава прямых и обратных прочтений нет видимых различий между секвенаторами. У платформы наблюдалась сильная корреляция по количеству обнаруженных генов и UMI у баркодированных участков (спотов) срезов. Также сильная корреляция выявлена между профилями экспрессии общих генов в спотах срезов, секвенированных на двух платформах. После объединения и нормализации без поправки батч-эффекта совершены снижение размерности и кластеризация данных. Получено, что срезы не имеют видимых различий между кластерами и UMAP-координатами. Проведен поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) у аннотированных кластеров. Найдено, что большинство обнаруженных ДЭГ ( $\log_2FC > 0,25$  и  $FDR < 0,01$ ) пересекаются между NGS-платформами, а уникальные находятся на пороге выставленных пределов  $\log_2FC$  и менее значимы по сравнению с общими ДЭГ.

Несмотря на незначительные различия между качеством прошедшего секвенирования и числом обнаруженных генов, две исследуемые платформы не имеют видимых различий. Это подтверждают результаты кластеризации, значительное число общих ДЭГ у кластеров, а также случайная природа уникальных ДЭГ, которые находятся на пороге выставленных пределов  $\log_2FC$ . Таким образом, платформа Genolab M дает близкие к NextSeq 2000 результаты и может быть использована для секвенирования таких библиотек, как 10x Genomics Visium.

### Литература

1. Stahl P. L., Salmen F., Vickovic S. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics // Science. 2016. Vol. 353 (6294). P. 78–82.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-75-10021 и благодаря участию Международной ассоциации клинических трансляционных исследований 10x Genomics CTRN.

© П. С. Ямщиков, И. В. Ларионова, Ф. А. Кошкин, Д. В. Пьянков, Е. В. Денисов, 2022

---

2. Slatko B. E., Gardner A. F., Ausubel F.M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies // *Curr. Protocols Mol. Biol.* 2018. Vol. 122 (1). e59.

3. Liu Y., Han R., Zhou L. et al. Comparative performance of the GenoLab M and NovaSeq 6000 sequencing platforms for transcriptome and LncRNA analysis // *BMC Genomics*. 2021. Vol. 22 (1). e829.

## РАЗДЕЛ II

## БИОТЕХНОЛОГИИ

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ НОВОЙ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ВЕКТОРНОЙ  
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА КРС \*

Ж. С. Абай, К. А. Шораева, С. О. Садикалиева, К. К. Джекебеков,  
Е. П. Воронина, Н. С. Сырым, М. М. Касенов, Б. А. Еспембетов, А. С. Нурпейсова

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, пгт. Гвардейский, Казахстан

✉ abaizh097@mail.ru

**Аннотация**

Приготовлены опытно-лабораторные серии векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота (КРС) из рекомбинантных штаммов, полученные методом обратной генетики, экспрессирующие протективные белки *M. bovis*: TB10.4, ESAT-6. Оптимизированы условия культивирования рекомбинантных вирусов гриппа для получения вакцины. Ведутся работы по определению безопасности и протективности таких вакцин на моделях лабораторных животных и КРС. Область применения — ветеринария.

Туберкулез КРС — хроническое заболевание, вызываемое бактерией *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) и приводящее к потере продуктивности КРС, тем самым нанося вред здоровью населения. Подсчитано, что в некоторых развивающихся странах до 10 % случаев туберкулеза человека вызвано туберкулезом КРС. В связи с этим своевременная профилактика данной инфекции является все еще актуальной задачей.

Согласно литературным данным, использование аттенуированных вирусов в качестве вектора для доставки генов и их экспрессии в организме позволяет повысить иммуногенность иммунобиологических препаратов *M. Bovis* и доставить протективные белки в составе вакцины без применения адъювантов [1].

В нашей работе в качестве вектора использован вирус гриппа А с открытой рамкой считывания NS1-белка, методом обратной генетики конструированы рекомбинантные штаммы, экспрессирующие протективные белки *M. bovis*: TB10.4, ESAT-6. Ранее коллегами были проведены аналогичные работы по разработке человеческой векторной вакцины против туберкулеза, экспрессирующей белки *M. tuberculosis*. Разница между двумя работами заключается во встроенных микобактериальных белках.

Известно, что открытием последних годов является создание векторных вакцин на основе антигенов *M. bovis*, кодирующих протективные белки [2]. К их числу относятся хорошо изученные белки комплекса Ag85, TB10.4 и ESAT-6 [3]. По литературным данным, эти белки в моделях животных показывали высокий уровень защиты от туберкулеза [4].

Таким образом, генно-инженерным методом обратной генетики получены варианты рекомбинантных штаммов с химерным геномным фрагментом NS, кодирующим антигены *M. bovis* TB10.4, ESAT6 и их консорциум. Все рекомбинантные штаммы успешно восстановлены в системе куриных эмбрионов. Первый этап клонирования показал сохранность генетической химерной конструкции в геномном сегменте NS, что подтверждено результатами электрофоретического анализа продуктов амплификации ОТ-ПЦР.

Введутся исследования по определению безопасности и протективности полученных нами различных вариантов вакцины на моделях лабораторных животных и КРС. Успешное выполнение и реализация данного исследования дает возможность разработать новую отечественную векторную вакцину против туберкулеза КРС, которая будет доступна по цене, что поднимет уровень конкурентоспособности отечественного производства на мировом рынке ветеринарной биотехнологии.

\* Исследования выполнены в рамках грантового проекта AP09259683 «Разработка технологии изготовления векторной вакцины для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

© Ж. С. Абай, К. А. Шораева, С. О. Садикалиева, К. К. Джекебеков, Е. П. Воронина, Н. С. Сырым, М. М. Касенов, Б. А. Еспембетов, А. С. Нурпейсова, 2022

**Литература**

1. Li J., Hou G., Wang Y. et al. Influenza viral vectors expressing two kinds of HA proteins as bivalent vaccine against highly pathogenic avian influenza viruses of clade 2.3.4.4 H5 and H7N9 // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 604.
2. Meikle V., Alito A., Llera A. S. et al. Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions // *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. Vol. 16, № 9. P. 1352–1359.
3. Pollock J. M., Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis // *J. Infectious Diseases.* 1997. Vol. 175, № 5. P. 1251–1254.
4. Chang-hong Sh., Wang X-W., Zhang H. et al. Immune responses and protective efficacy of the gene vaccine expressing Ag85B and ESAT6 fusion protein from *Mycobacterium tuberculosis* // *DNA Cell Biol.* 2008. Vol. 27, № 4. P. 199–207.

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

А. С. Абрамова<sup>1,2</sup>, А. А. Соловьев<sup>1</sup>, Ц. С. Гарибян<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,  
лаборатория маркерной и геномной селекции растений, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ tsovinar1980@mail.ru

### Аннотация

Для повышения эффективности селекции подсолнечника в последнее время интенсивно используются методы геномной селекции. В связи с этим усовершенствование методов выделения протопластов различных сортов подсолнечника — актуальная задача сельскохозяйственной биотехнологии.

Протопласты получают для исследований клеток и геномной инженерии. Путем химических и механических методов выделяют и исследуют структурные компоненты и даже отдельные молекулы, вносят изменения в генетическую структуру и т. д. Протопласты могут регенерировать клеточную оболочку, что необходимо, в частности, для получения полноценных генетически измененных клеток.

Протопласты используются в соматической гибридизации для создания новых растений, например, как описано в недавних работах, путем слияния протопластов с аспектами процедур, применяемых в этой технологии, включая отбор гибридных клеток и растений [1, 2]. Цель данной работы — улучшить методы выделения протопластов разных сортов подсолнечника.

Протопласты растений используются уже более двух десятилетий и стали одним из самых разносторонних аналитических средств биологии растений. Их можно выделить из различных тканей или органов. Освободившись от целлюлозных клеточных стенок, плазматическая мембрана становится доступной для исследования [3].

Выделение протопластов осуществляется ферментативным перевариванием различных видов растительной ткани. Среди широко используемых ферментов: целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы [4].

На высвобождение протопластов влияет несколько факторов, в том числе степень утолщения клеточной стенки, температура, продолжительность инкубации фермента, оптимумы pH ферментного раствора [5] и характер осмотика [6].

Объектами исследований служили растения отечественного подсолнечника (*Helianthus annuus L.*) сортов Победа, СПК и Джинн. Для выделения протопластов подсолнечника отбирали экспланты (листья) из 14-дневных стерильных растений.

Полученные экспериментальные данные показали, что оптимальное время обработки ферментами для листьев всех сортов подсолнечника — 16 ч. Определение концентрации ферментов выявило, что одновременное добавление 500 мг/л *Cellulase* и 500 мг/л *Macerozyme* оказалось наиболее эффективным, а увеличение концентрации *Cellulase* и *Macerozyme* приводит к резкому снижению выхода жизнеспособных протопластов.

Максимальное количество жизнеспособных протопластов получено из мезофилла листа подсолнечника сорта Джинн. Подобран соответствующий режим центрифугирования для успешного выделения протопластов: время центрифугирования 4 мин при 1000 об/мин (см. таблицу).

### Выход протопластов из листьев подсолнечника сорта Джинн в зависимости от режима центрифугирования ( $\times 10^6$ клеток/см<sup>3</sup>)

Об/мин	Время, мин		
	3	4	5
800	0,5	0,78	1,1
1000	1,0	1,7	0,65
1200	0,85	0,94	0,6

### Литература

1. Davey M. R., Anthony P., Power J. B., Lowe K. C. Protoplast applications in biotechnology // Encyclopaedia Plant Crop Sci. N. Y., 2004. P. 1061–1064.
2. Davey M. R., Lowe K. C., Power J. B. Protoplast fusion for the generation of unique plants // Encyclopaedia Cell Technol. N. Y., 2000. P. 1090–1096.



- 
3. Hinnisdaels S., Cammaerts D., Cherdshewasart W. et al. Plant protoplasts as genetic tool: selectable markers for developmental studies // *Int. J. Dev. Biol.* 36. 1992. P. 73–84.
  4. Kativat C., Poolsawat O., Tantasawat P.A. Optimization of factors for efficient isolation of protoplasts in sunflower (*Helianthus annuus L.*) // *Aust. J. Crop Sci.* 2012. Vol. 6. P. 1004–1010.
  5. Sinha A., Wetten A. C., Caligari P. D. S. Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts // *Aust. J. Bot.* 2003. Vol. 51. P. 103–109.
  6. Davey M. R. et al. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives // *Biotechnol. Adv.* 2005. T. 23, № 2. C. 131–171.

## ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТВОЛОВЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

А. А. Аитова

*Московский физико-технический институт*

✉ aitova.aa@phystech.edu

### Аннотация

В строме костного мозга существует подмножество негематопоэтических клеток, называемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Эти клетки могут быть размножены и далее дифференцированы в другие типы клеток, что делает их уникальным инструментом клеточной терапии.

Клеточная терапия — одна из многообещающих стратегий современной медицины. Тканевая инженерия сердца и клеточные технологии, включающие и прямую инъекцию клеток, являются ключевыми подходами для лечения заболеваний сердца, однако подобные методы сопряжены с рядом сложностей: функциональной активностью кардиомиоцитов после пересадки и возможностью иммунного ответа со стороны тканей хозяина [1]. Решением этих проблем служат стволовые клетки, полученные от пациента: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки и др. Способность таких клеток к дифференцировке в самые разные типы клеток позволяет использовать их в клеточной терапии. Остается проблема функциональной приживаемости клеток в ткани пациента [2].

Данная работа посвящена изучению паракринного эффекта при дифференцировке стволовых клеток. Паракринный эффект позволяет дифференцировать клетки непосредственно в ткани до терминальной стадии дифференцировки, что дает возможность создания межклеточных связей. Выявление этапов дифференцировки с помощью паракринного эффекта и возможности подсадки дифференцируемых клеток в ткань на разных этапах и являлись задачами данной работы. Для этого в работе использовались ИПСК и МСК человека. Поставлены и модифицированы протоколы выделения МСК из биопсии костного мозга человека [3]. Получены клеточные линии МСК. Тестировались подложки для оптимального культивирования и дифференцировки МСК: *Matrigel* (*Matrigel* — LDEV-FREE, MATRIGEL®, CORNING®), желатин, *Geltrex* и др. Выбрана оптимальная подложка, на которой достигалась необходимая плотность культуры. Получен один протокол дифференцировки из МСК в кардиомиоциты с помощью факторов из параллельной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты с выходом около 2 %. Описаны полученные из МСК кардиомиоциты. Далее данный протокол будет совершенствоваться для увеличения выхода кардиомиоцитов.

### Литература

1. Kehat I. et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2004. Т. 22, № 10. С. 1282–1289.
2. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // *Cell.* 2008. Т. 132, № 4. С. 567–582.
3. Majumdar M. K. et al. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells // *J. Cell Physiol.* 2000. Т. 185, № 1. С. 98–106.

## ФОТОБИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ НА ОСНОВЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УГЛЕРОДНОЙ ТКАНИ И ПРОВОДЯЩЕГО ГИДРОГЕЛЯ С PEDOT : PSS И ДОБАВЛЕНИЕМ НАНОТРУБОК

М. С. Аксенова, П. М. Готовцев

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва  
Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ ams0507@yandex.ru

### Аннотация

В данной работе показана возможность преобразования солнечной энергии в электрический ток с помощью двухкамерного биотопливного элемента с использованием новых материалов электродов. Также достигнут ток порядка 8 мкА.

### Актуальность

Использование фотосинтезирующих бактерий — перспективное направление развития зеленой энергетики [1]. Для этого применяются двухкамерные ячейки, и главным ограничением, влияющим на их производительность, является материал электродов [2]. До сих пор производительность биотопливных элементов остается низкой, поэтому в данной работе рассматриваются новые материалы электродов для повышения эффективности ячейки.

**Цель работы** — получение электрического тока с помощью биотопливного элемента с использованием новых материалов электродов.

### Материалы и методы

В ходе работы была собрана двухкамерная ячейка (рис. 1). Анодная камера представляет собой открытую емкость с прямым доступом к воздуху и свету. В качестве анода использовалась углеродная ткань, на которую нанесли биопленку цианобактерии *Arthrospira platensis*. Иммунизация клеток проведена по методике [3]. Приготовлен раствор из бактерий, проводящего полимера PEDOT : PSS и диглицидилового эфира полиэтиленгликоля в соотношении 4 : 1 : 1 соответственно, нанесен на углеродную ткань и высушен при температуре 25 °С. Ток снимался с помощью золотых штырьков, которые протыкали углеродную ткань. Анодная и катодная камера разделяются протонопроводящей мембраной Nafion 115.

Катодная камера представляет собой емкость с водой с открытым доступом к воздуху. Катод — гидрогель на основе PEDOT : PSS с добавлением нанотрубок 2 мас. %, приготовленный по методике [3]. Ток снимался с помощью плотно прижатой никелевой пластины.

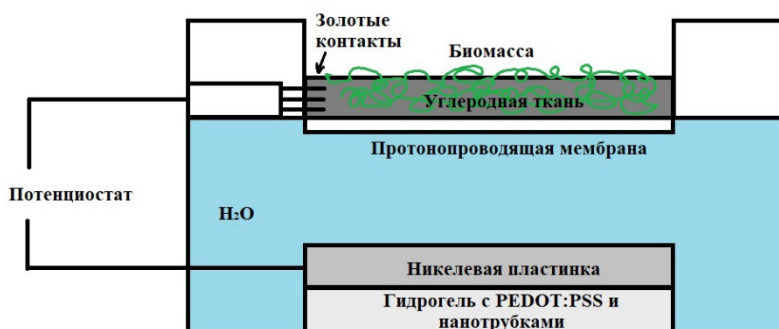


Рис. 1. Двухкамерная ячейка

### Результаты

Зафиксирован ток порядка 8 мкА, измерения проводились в течение 7,5 мин. Снята вольтамперная характеристика ячейки на свету и в темноте (рис. 2). Сравнительный анализ полученных результатов показывает, что ток увеличивается при освещении бактерий и уменьшается, когда они находятся без света.

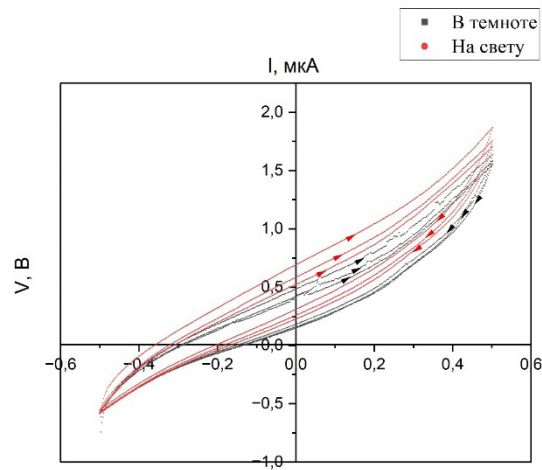


Рис. 2. Вольтамперная характеристика биотопливного элемента на свету и в темноте

Таким образом, с новыми электродами удалось получить электрический ток, который обусловлен работой цианобактерий.

#### Литература

1. Mohan S. V., Sravan J. S., Butti S. K. et al. Microbial Electrochemical Technology: Emerging and Sustainable Platform // Sustainable Platform Fuels, Chem. Rem. Biomass, Biofuels Biochem. 2019. P. 3–18.
2. Sokhee P. J., Soumya, Pandit Important Factors Influencing Microbial Fuel Cell Performance // Sustainable Platform Fuels, Chem. Rem. Biomass, Biofuels Biochem. 2019. P. 377–406.
3. Gotovtsev P. M., Badranova G. U., Zubavichus Y. V. et al. Electroconductive PEDOT : PSS-based hydrogel prepared by freezing-thawing method // Heliyon 2019. Vol. 5. P. e02498.

THE METAGENOMIC COMMUNITIES OF *TUBER AESTIVUM* COLLECTED IN RUSSIA\*

D. V. Axenov-Gribanov<sup>1,2</sup>, E. V. Pereliaeva<sup>1</sup>, M. M. Morgunova<sup>1</sup>, N. A. Imidoeva<sup>1</sup>, M. E. Dmitrieva<sup>1</sup>,  
A. Y. Belyshenko<sup>1</sup>, T. Y. Telnova<sup>1</sup>, A. A. Vlasova<sup>1</sup>, A. Y. Ruleva<sup>1</sup>, V. N. Shelkovnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Irkutsk State University

<sup>2</sup>MycoTech LLC

✉ Denis.axengri@gmail.com

**Abstract**

Truffle mushrooms are one of the least studied groups of fungi. Here, we characterized the prokaryotic and eukaryotic organisms living in the Russian truffle related to *Tuber aestivum* for the first time. The sequencing of hypervariable fragments of 16S rRNA and 18S rRNA genes led to identify the plant pathogens, involved in the symbiotic relationships with truffle mushrooms.

Truffle mushrooms are one of the least studied groups of fungi. Growing under the surface of land, these organisms are characterized by a wide landscape of non-studied biological questions. Being delicious for people, biological and biotechnological role of these fungi is little assessed. Being an invisible for trivial walker, this organism is one of the less characterized both in its ecology and biotechnology.

The Russian Federation, and their south regions are examples of ecosystems where truffle mushrooms and their biological and biomedical potentials were never studied. Here, we primary characterized the prokaryotic and eukaryotic organisms living in the Russian truffle related to *Tuber aestivum*. The rate of true truffle in the consortium of eukaryotic organisms varied from 42 to 54 %. The sequencing of hypervariable fragments of 16S rRNA and 18S rRNA genes led to identify the plant pathogens, involved in the symbiotic relationships with truffle mushrooms.

Prokaryotic community of *T. aestivum*, collected in Russia (Sochi city) was presented by 27 bacterial genera. As described, the representative of *Pseudomonas* sp. was dominating group of bacteria (OTU's  $19.94 \pm 17.15$  %), inhabiting ascomata of *Tuber aestivum*. Predominant group of bacteria were presented by such genus, as *Rahnella* sp. (OTU's  $4.3 \pm 0$  %), *Enterobacter* sp. (OTU's  $2.0 \pm 0.46$  %), *Stenotrophomonas* sp. (OTU's  $1.3 \pm 1.10$  %). Also, several minor groups of bacteria were found the fruiting bodies of truffle fungi (OTU's less than 1 %). These genera of bacteria were presented by *Acinetobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Comamonas* sp., *Enterohabdus* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., *Massilia* sp., *Nitrobacter* sp., *Nocardioides* sp., *Pedobacter* sp., *Ralstonia* sp., *Raoultella* sp., *Rahnella* sp., *Rhizobium* sp., *Sphingobacterium* sp., and *Staphylococcus* sp.

Eukaryotic community of the black truffle *T. aestivum*, collected in Russia consists of the fungi (OTU's  $52.3 \pm 5.26$  %), protists (OTU's  $10.6 \pm 4.7$  OTU's), and undescribed taxon ( $15.06 \pm 1.32$  %). The fungal community of *T. aestivum* was presented by 13 genera, such as *Alternaria* sp. (OTU's  $3.4 \pm 0$  %), *Ascobolus* sp. (OTU's  $4.4 \pm 2.42$  %), *Cladophialophora* sp. (OTU's  $1.6 \pm 0$  %), *Holtermanniella* sp. (OTU's  $1.8 \pm 0$  %), *Hyaloscypha* sp. (OTU's  $2.7 \pm 0$  %), *Mortierella* sp. (OTU's  $1.1 \pm 0.47$  %), *Penicillium* sp. (OTU's  $4.9 \pm 2.57$  %), *Papulaspora* sp. (OTU's  $3.03 \pm 0$  %), *Psathyrella* sp. (OTU's  $0.73 \pm 0$  %), *Rhodotorula* sp. (OTU's  $2.03 \pm 0$  %) and *Tylospora* sp. (OTU's  $4.5 \pm 0$  %).

Thus, in this study we first time demonstrated the diversity of prokaryotic and eukaryotic organisms associated with Russian truffle *T. aestivum*. Many of the mentioned species of prokaryotic and eukaryotic organisms have influences of the representatives of truffle mushrooms and help them to form mycorrhiza with trees.

\*The study was performed in laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, created in ISU, and supported by GreenTechBaikal LLC by the realization of the project of RSF 20-76-00001. The analysis of obtained data was supported by project of RSF 22-76-10036. Partly, the research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the competition aimed at the creation of new laboratories in scientific organizations in the interests of the Regional Scientific Education Centre "Baikal", Internal Theme 091-21-114, State registration 121111100025-5 at 11 November 2021).

© D. V. Axenov-Gribanov, E. V. Pereliaeva, M. M. Morgunova, N. A. Imidoeva, M. E. Dmitrieva, A. Y. Belyshenko, T. Y. Telnova, A. A. Vlasova, A. Y. Ruleva, V. N. Shelkovnikova, 2022

## УВЕЛИЧЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ DC-SIGN ПОВЫШАЕТ ПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ККГЛ В ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ\*

Д. А. Алхиреев, А. В. Зайковская, А. А. Дольский, О. В. Пьянков, А. К. Матвеева, Д. В. Юдкин

*Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий — Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

✉ darya.a.00@yandex.ru

### Аннотация

Для изучения механизмов взаимодействия вируса с клеткой необходимы адекватные клеточные модели. Так как нативные клеточные линии могут быть невосприимчивы к вирусу, создание трансгенных клеточных линий — актуальная задача. Получены генномодифицированные клеточные линии, экспрессирующие рецептор DC-SIGN, и показано его участие в заражении клеток вирусом ККГЛ.

Вирусологические исследования и разработка противовирусных препаратов требуют наличия адекватных моделей. Одним из вариантов таких моделей могут служить клеточные линии, которые в полной мере отражают механизмы взаимодействия вируса с клеткой. Клеточные линии бывают нативные и генномодифицированные, у каждого вида есть свои преимущества и недостатки. Так, нативные клетки могут быть невосприимчивы к вирусам, как и исходные организмы, из которых они получены. Этот недостаток отсутствует у генномодифицированных клеточных моделей. Они могут быть иммунодефицитными (чувствительные ко всем вирусам) или трансгенными (вируспецифичные за счет наличия рецептора для проникновения вируса в клетку). Одним из таких рецепторов является DC-SIGN (CD209), используемый многими вирусами. Например, вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), относящийся к роду *Nairovirus* из семейства *Bunyaviridae*, для некоторых родов (*Phlebovirus*, *Arenavirus*) которого показано участие рецептора DC-SIGN в заражении клеток.

Цель данной работы — получение клеточной линии, экспрессирующей рецептор DC-SIGN, и проверка ее чувствительности к вирусу ККГЛ.

Трансгенез осуществляли путем доставки генетической конструкции, содержащей открытую рамку считывания гена DC-SIGN и ген пурамицин N-ацетилтрансферазы (ген устойчивости к пурамицину), с помощью системы транспозона *Sleeping Beauty*. Далее селекцию проводили на пурамицине для отбора клеток, содержащих трансген. Уровень экспрессии на уровне мРНК определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Заражение производили вирусом ККГЛ от 2,3 до 259 МОИ. Вирусную нагрузку анализировали с помощью ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции.

Исследовано три клона трансгенных клеточных линий и показано изменение экспрессии DC-SIGN на уровне мРНК по сравнению с исходной клеточной линией. Продемонстрировано повышение вирусной нагрузки в одной из полученных линий клеток относительно исходной линии. Выявлена зависимость вирусной нагрузки от экспрессии рецептора DC-SIGN, что свидетельствует об его участии в проникновении вируса ККГЛ в клетку.

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2019-1665).

**ПОЛУЧЕНИЕ ФАГОВОЙ БИБЛИОТЕКИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА ЛАССА\***

В. С. Арипов<sup>1</sup>, Е. Д. Мордвинова<sup>1</sup>, А. В. Таранин<sup>2</sup>, Л. В. Мечетина<sup>2</sup>,  
Л. И. Карпенко<sup>1</sup>, А. А. Ильичёв<sup>1</sup>, Н. В. Волкова<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

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

✉ aripov\_vs@vector.nsc.ru

**Аннотация**

Работа посвящена конструированию фаговой библиотеки антител на основе разнообразия иммунизированных лам. Приведено описание иммуногена и способа иммунизации, показано, что иммунизация псевдовирусами, несущими поверхностный белок вируса Ласса, приводит к формированию вируснейтрализующих антител. На основе иммунного разнообразия сконструирована фаговая библиотека антител.

Помимо антител традиционной структуры, у представителей семейства верблюдовых обнаружен класс однодоменных антител (наноантитела) [1]. Такие антитела имеют преимущества перед традиционными и уже широко используются для решения ряда задач [2, 3]. Ежегодная заболеваемость, обусловленная вирусом Ласса (LASV), колеблется от 100 000 до 300 000 случаев, а смертность составляет 5 000–10 000 смертей в год [4, 5]. Почти все случаи заражения регистрируются на территории Западной Африки. Однако выявление вторичной передачи вируса за пределами Африканского континента ставит перед специалистами задачу создания профилактических и терапевтических препаратов для своевременного противодействия этой инфекции.

**Цель нашего исследования** — получение фаговой библиотеки антител против вируса Ласса на основе лимфоцитов крови лам, иммунизированных псевдовирусами LASV.

Для получения наноантител, нейтрализующих вирус Ласса, проведена иммунизация одной лампы псевдовирусами на основе вируса везикулярного стоматита, псевдогипериммунизированной поверхностным белком LASV-GPC. Иммунизацию проводили с помощью четырех последовательных инъекций. Кровь собирали через 5 дней после последней иммунизации. Нейтрализующую активность антител в иммунизированной сыворотке измеряли с использованием псевдовирусов LASV. Титр нейтрализующих антител составил 1/600.

После определения нейтрализующей активности сыворотки иммунизированного животного выделена тотальная РНК из лимфоцитов крови [6]. Затем выделенную РНК перевели в кДНК согласно протоколу [6]. Для амплификации переменных доменов всех тяжелых цепей иммуноглобулина (VH и VHH) из кДНК использовали специфические праймеры CALL001 и CALL002 [6]. В результате проведения ПЦР амплифицировалось два фрагмента ДНК: фрагменты размером примерно 700 п. н., представляющие репертуар антител, состоящих только из тяжелых цепей наноантител, и фрагменты размером 1000 п. н., соответствующие тяжелой цепи обычных антител. ПЦР-продукт размером 700 п. н. амплифицировали повторно с применением праймеров VHH-Back и VHH-For [6]. Полученный ПЦР-продукт был встроен в вектор pHEN4. Лигазной смесью трансформированы клетки TG1 с помощью электропорации. Оценочный размер полученной фаговой библиотеки антител составил  $6 \times 10^{10}$ .

**Литература**

1. Maass D. R., Sepulveda J., Pernthaner A. et al. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs) // *J. Immunol. Methods*. 2007. Vol. 324. P. 13–25.
2. Van Bockstaele F., Holz J. B., Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2009. Vol. 10, № 11. P. 1212–24.
3. Gorchakov A. A., Kulemzin S. V., Guselnikov S. V. et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern // *Cell Discov*. 2021. Vol. 7. P. 96.
4. McCormick J. B., Webb P. A., Krebs J. W. et al. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever // *J. Infect. Dis*. 1987. Vol. 155, № 3. P. 437–444.
5. Kay Richmond J., Baglolle D. J. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences // *BMJ*. 2003. Vol. 327, № 7426. P. 1271–1275.
6. Pardon E., Laeremans T., Triest S. et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology // *Nat. Protoc*. 2014. Vol. 9. P. 674–693.

\* Работа выполнена в рамках темы ГЗ-23/21 плана основных мероприятий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на 2022 г.

© В. С. Арипов, Е. Д. Мордвинова, А. В. Таранин, Л. В. Мечетина, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв, Н. В. Волкова, Д. Н. Щербаков, 2022

## BIPLEX BINARY DEOXYRIBOZYME ASSAY FOR DIFFERENTIATION OF *BACILLUS CEREUS* SPECIES

M. Ateiah<sup>1</sup>, E. Gandalipov<sup>1</sup>, M. Rubel<sup>1</sup>, D. M. Kolpashchikov<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>ITMO University, Laboratory of Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies, St. Petersburg

<sup>2</sup>Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA

<sup>3</sup>Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA

✉ muhammad@scamt-itmo.ru

### Abstract

Among many foodborne pathogens, *Bacillus* genus stands separately due to its diversity and ubiquitous spread along the biosphere. Certain species are pathogenic with food borne and infectious potential. For instance, *Bacillus cereus* is a well-recognized pathogen that cause two different forms of food poisoning including emesis and diarrhea [1]. In contrast to *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis* is categorized as non-harmful for humans and exploited as a pesticide. Nonetheless, *B. thuringiensis* has also been reported in the context of foodborne outbreaks. The actual share of the *B. thuringiensis* and *B. mycooides* in foodborne outbreaks is still hitherto unknown due to complexity of the genetic discrimination between the *Bacillus* species. Especially, genomes of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycooides* are infused with each other. The 16S rRNA sequences of *B. mycooides* and *B. thuringiensis* differed from each other and from the sequences of *B. cereus* and *B. anthracis* by 0 to 9 nucleotides. Up this date, there is no well-established approach in routine diagnostics to discriminate the pathogen origin and so the International Organization for Standardization (ISO) guidelines presume all the *B. cereus* group outbreaks as by *B. cereus* origin (ISO 7932:2004). Additional different tests has been implied but not introduced into routine practice due to complexity, laborious and high cost. (ISO 7932:2004/DAM 1:2018).

DNA nanoconstructs, that follow the concept of molecular machines, by having a sensing part and actuating part. DNA-nanoconstructs became a spotted field for researchers, who are working in the diagnostic and therapeutic fields. One of the promising variants is the binary DNAzyme (10–23) based sensors. Several scientists proposed different machines based on the DNAzyme 10–23 in the last decades [2]. In later years the binary sensors evolved into tile-equipped DNA-nanomachines [3].

This study aims to develop an amplification-free assay for discrimination of *B. mycooides* and *B. thuringiensis* bacteria with the use of fluorescent DNA-nanoconstructs. In this study, we developed 6 DNA-nanoconstructs for the detection and differentiation of *B. thuringiensis* and *B. mycooides* with the use of *B. cereus* as a control strain. For each stain, three DNA-nanoconstructs were developed. The DNA-nanoconstructs are: Binary Split Deoxyribozyme (BiDz) sensor, 3 Arm DNA nanomachine (DNM 1-1), and 4 Arm DNA nanomachine (DNM 1), attributable to one or two additional unwinding arms in comparison to BiDz sensor, respectively. Two variants of the universal reporter probe were used with each DNA nanoconstructs targeting a stain; Universal probe F-sub was used while detecting *B. thuringiensis* and Universal probe Cy5 was used for *B. mycooides*.

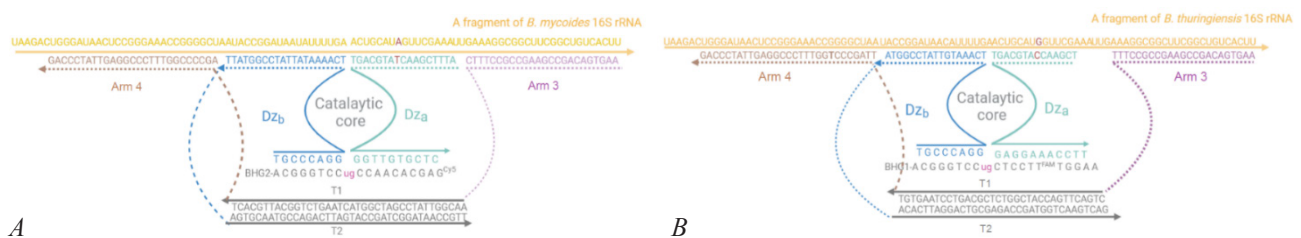


Fig. 1. The design of the advanced DNMs-1. A — DN1 targeting *Bacillus thuringiensis*; B — DN1 targeting *Bacillus mycooides*.

The DNMs consist of 3 main parts: the separated Arm 1 (Dz<sub>a</sub>), T1, and T2. T2 contains arm 2 (Dz<sub>b</sub>) while T1 has 2 arms (3 and 4) both are connected with spacers to Tile 1. Both T1 and T2 are complementary to each other to form a double-stranded platform that holds all the three arms together.

Strains of *B. mycooides* and *B. thuringiensis* were successfully detected and discriminated by the DNMs 1 and DNMs 1-1, but not by the BiDz sensor. However, the DNMs 1 showed higher sensitivity compared to DNMs 1-1 and Binary Split Deoxyribozymes, presumably due to greater ability to unwind the target RNA secondary structure with additional arms. Limit of detection was determined by 1–1.5 ng of the target 16S rRNA for the DN1.



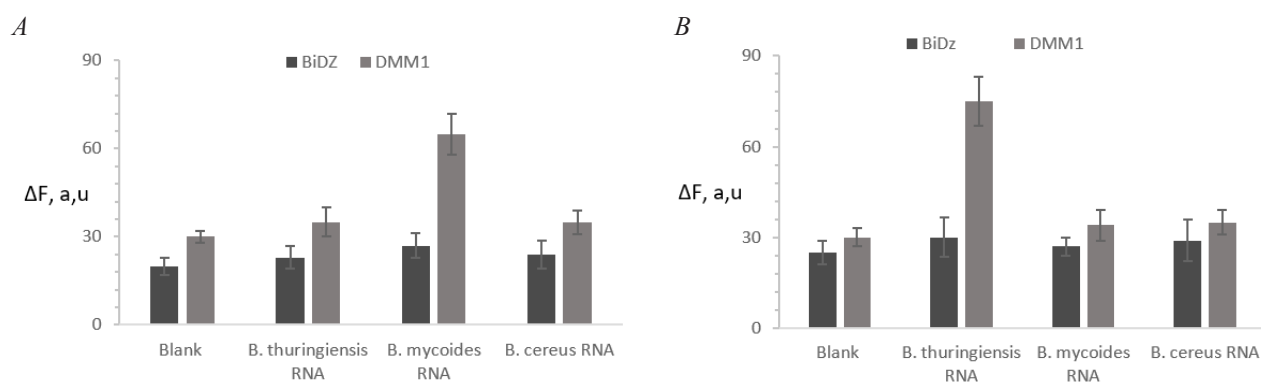


Fig. 2. *A* — Fluorescence intensities of *B. thuringiensis*-specific BiDz (dark gray bars) and DMM 1 (light gray bars) in the absence or the presence of 10 ng of *B. thuringiensis* RNA, *B. mycooides* RNA and *B. cereus* RNA after 1 hour of incubation at 55 C in the FAM channel; *B* — Fluorescence intensities of *B. mycooides* -specific BiDz (dark gray bars) and DMM 1 (light gray bars) in the absence or the presence of 10 ng of *B. thuringiensis* RNA, *B. mycooides* RNA and *B. cereus* RNA after 1 hour of incubation at 55 C in the Cy5 channel. Average values of 3 independent measurements are presented with one standard deviation.

### References

1. Bravo A., Likitvivanavong S., Gill S. S., Soberón M. Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide // Insect. Biochem. Mol. Biol. 2011. Vol. 41. P. 423–431.
2. Kolpashchikov D. M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // Acc. Chem. Res. Am. Chem. Soc. 2019. Vol. 52. P. 1949–1956.
3. Lyalina T. A., Goncharova E. A., Prokofeva N. Y. et al. A DNA minimachine for selective and sensitive detection of DNA // Analyst. 2019. Vol. 144. P. 416–420.

## СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ FFA1\*

Д. А. Багнюкова, А. Ю. Лукин

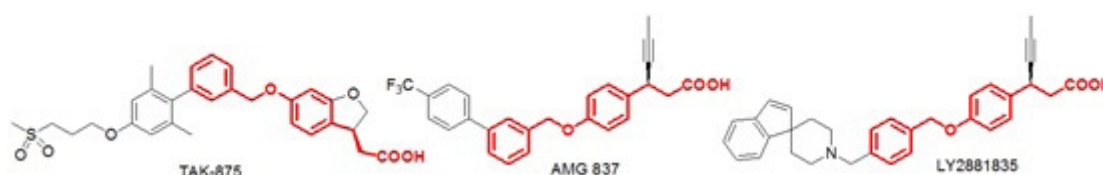
*Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, Москва*

✉ bagdarya@yandex.ru

### Аннотация

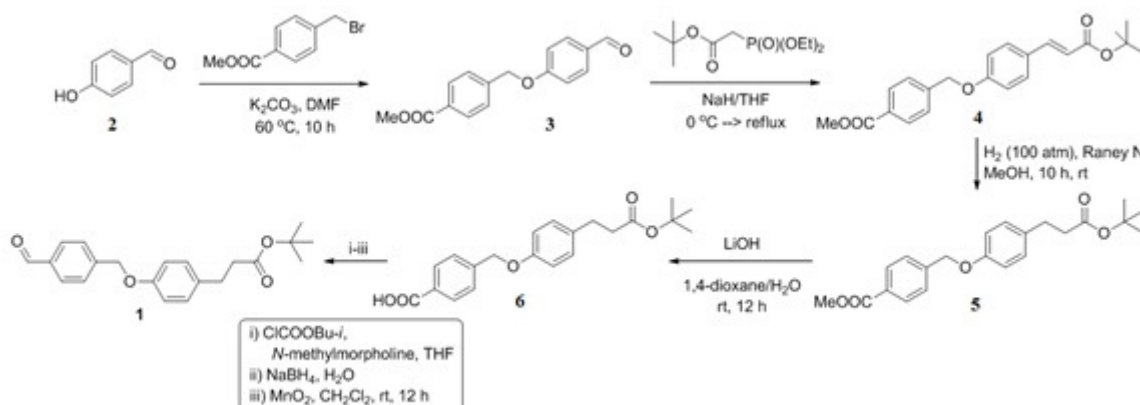
Свободные жирные кислоты играют ключевую роль в повышении глюкозостимулированной секреции инсулина. Цель работы — синтез и исследование свойств потенциальных агонистов рецептора свободных жирных кислот FFA1.

Продвинутые агонисты FFA1, такие как TAK-875, Amgen's AMG-837, и Eli Lilly's LY2881835, имеют в своей структуре общий фармакофорный фрагмент.



Также молекула LY2881835 содержит спироциклический третичный амин, что увеличивает полярность агонистов FFA1 и имеет решающее значение для будущего клинического успеха.

С целью получения фармакофорного фрагмента молекул агонистов предложен и проведен многостадийный синтез защищенного альдегидного синтона **1**, не описанный ранее в литературе [1].



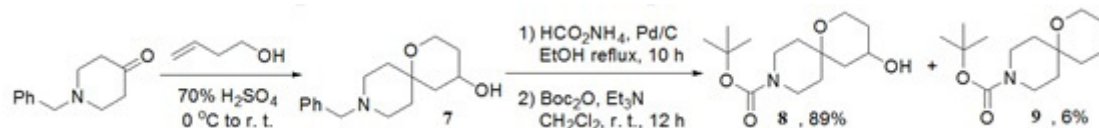
Синтез начинался с коммерчески доступного 4-гидроксibenзальдегида **2**, который подвергался алкилированию метиловым эфиром-4-(бромметил)бензойной кислоты с получением альдегида **3** (выход 67 %). Дальнейшее олефинирование по Хорнеру — Вадсворту — Эммонсу с использованием коммерчески доступного трет-бутил фосфоноацетата и гидрида натрия в качестве основания приводило к образованию трет-бутилового эфира коричной кислоты **4** (выход 84 %). Следующее превращение представляло некоторую трудность, так как двойную связь в сложном эфире коричной кислоты необходимо было гидрировать в присутствии бензильного эфира, который также может быть подвергнут расщеплению. Это наблюдалось при попытке осуществить гидрирование над палладиевыми катализаторами (5–10 % Pd/C или Pd(OH)<sub>2</sub>). Рабочим оказался подход с применением катализатора никеля Ренея, и был получен продукт селективного восстановления двойной связи **5** (выход 100 %).

Последним препятствием на пути к получению целевого соединения был гидролиз метилового эфира при сохранении трет-бутилового эфира. При использовании KOH или NaOH, помимо омыления метилового эфира, наблюдалось значительное (до 40 %) образование продукта омыления двух эфирных групп. Достигнуть высокой селективности протекания реакции удалось благодаря использованию в качестве основания LiOH в системе «ТГФ — вода», в этом случае карбоновая кислота **6** получалась с выходом 70 %. Последняя

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00069).

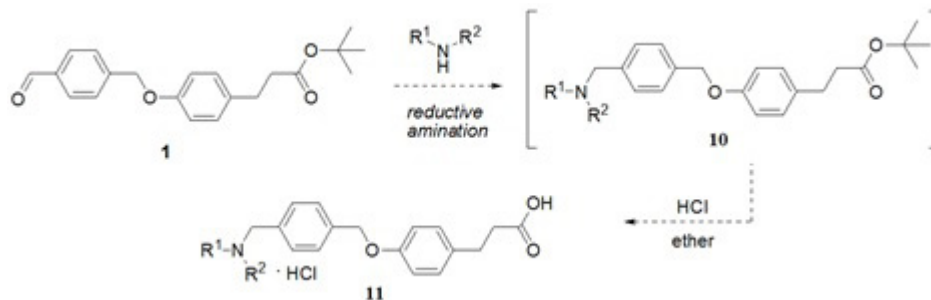
преобразована в смешанный ангидрид с изобутилхлорформиатом и восстановлена *in situ* с помощью боргидрида натрия (в присутствии воды) до гидроксиметильного производного, которое без дополнительной очистки было окислено с помощью активированного оксида марганца до альдегида **1** (суммарный выход по 2 стадиям — 61 %).

Для синтеза спироциклических синтонов использован подход, основанный на реакции циклизации Принса, в которой ненасыщенный спирт и альдегид реагируют с образованием гетероциклического соединения. В литературе описан метод получения спироциклического остова, но он обладает рядом недостатков: низкий выход, сложное выделение, применение металлоорганических реагентов [2]. Поэтому было необходимо разработать оптимальную методику. Предложен одностадийный метод синтеза аминспирта **7** с помощью 70 % серной кислоты, *N*-бензилпиперидона-4 и 3-бутенола [3]:

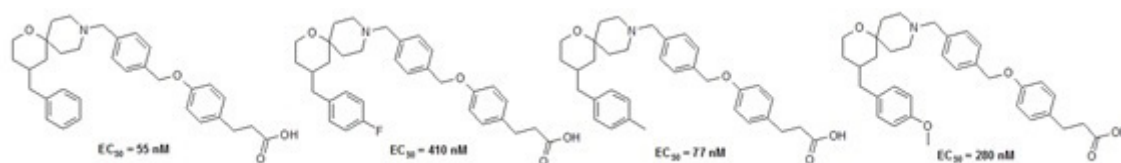


Данный протокол был применен для ряда других циклических аминокетонов, имеющих разную химическую структуру [3]. При этом получали соответствующие спироциклические продукты с хорошими выходами (44–70 %).

Проведен параллельный синтез аналогов агонистов рецептора GPR40 по реакции восстановительного аминирования.



Для полученных соединений в дальнейшем была определена их способность активировать GPR40 на линии клеток китайского хомячка (CHO). Ниже представлены структуры и значения  $EC_{50}$  наиболее эффективных лигандов [4].



### Литература

1. Lukin A., Bagnyukova D., Zhurilo N., Krasavin M. Gram-scale synthesis of a novel core building block for the new GPR40 agonist design // *Lett. Org. Chem.* 2016. Vol. 13 (10). P. 491–495.
2. Ghosh A. K., Shin D., Schiltz G. Multicomponent reactions: Synthesis of spirocyclic tetrahydropyran derivatives by prins cyclization // *Heterocycles.* 2002. Vol. 58. P. 659–666.
3. Lukin A., Bagnyukova D., Kalinchenkova N. et al. Spirocyclic amino alcohol building blocks prepared via a prins-type cyclization in aqueous sulfuric acid // *Tetrahedron Lett.* 2016. Vol. 57 (30). P. 3311–3314.
4. Krasavin M., Lukin A., Bagnyukova D. et al. Free fatty acid receptor 1 (GPR40) agonists containing spirocyclic periphery inspired by LY2881835 // *Bioorg. Med. Chem.* 2016. Vol. 24. P. 5481–494.

## ТЕМПЕРАТУРНО-ПЕРЕКЛЮЧАЕМЫЙ АУТОИНДУКТОР-РЕГУЛИРУЕМЫЙ ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР\*

С. В. Баженов, Е. С. Щеглова, И. В. Манухов

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ bazhenov1994@gmail.com

### Аннотация

Ряд экспрессионных векторов для *Escherichia coli* был создан с использованием элементов *Quorum Sensing* системы типа *luxR/luxI* психрофильных бактерий *Aliivibrio logei*. Синтез целевого белка происходит при снижении температуры до 20–22 °С и прекращается при ее повышении до 37 °С. Экспрессия целевого гена при низкой температуре зависит от концентрации аутоиндуктора в культуральной среде в диапазоне от 1 нМ до 10 мкМ. При наличии гена *luxI* возможна аутоиндукция.

Экспрессионные системы широко применяются в биотехнологии и молекулярной биологии. Они определяются совокупностью ферментов, участвующих в экспрессии целевых генов и ее регуляции. На сегодняшний день доминирующее положение занимают экспрессионные системы (чаще всего используются экспрессионные плазмидные вектора) в клетках *E. coli*. В данной работе создан ряд экспрессионных векторов (pIRAls, pIR-DPA1 и pR-DPA1) с помощью элементов *Quorum Sensing* системы психрофильных бактерий *A. logei*. Для регуляции транскрипции целевого гена применяются LuxR2-регулируемые промоторы и ген *luxR2 A. logei*. Белки LuxR-семейства из бактерий рода *Aliivibrio* способны связываться с N-3-оксогексаноил-L-гомосерин лактоном (аутоиндуктор, АИ), димеризоваться и, образуя комплекс с операторным участком ДНК (*lux*-бокс), активировать транскрипцию с близлежащего промотора [1]. В геноме психрофильных бактерий *A. logei* присутствует сразу 2 гена, кодирующих гомологичные LuxR1 и LuxR2 белки, однако LuxR2 обладает значительно более высокой чувствительностью к АИ, а для его корректного фолдинга в клетках *E. coli* необходимо наличие шаперонов [2]. Кроме того, LuxR2 в клетках *E. coli* подвержен деградации Lon-протеазой [2]. Последовательность *lux*-бокс представляет собой неидеальный палиндром длиной 20 пар нуклеотидов.

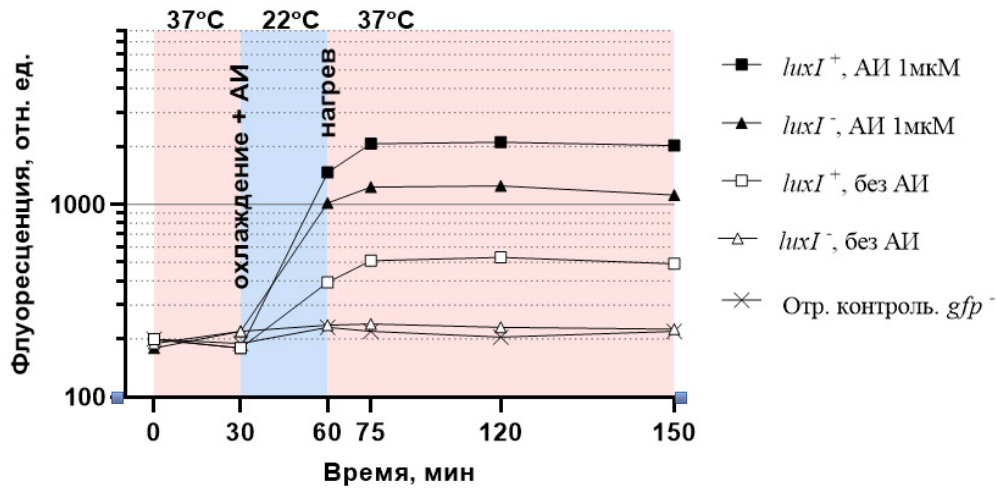
В представленной работе сконструировано несколько вариантов экспрессионного вектора. Все они содержат pBR322 ориджин репликации и ген устойчивости к канамицину, отличаются друг от друга по комбинации регуляторных элементов. pIRAls — вектор, содержащий противоположно ориентированные гены *luxR2* и *luxI* с разделяющей их промоторной областью, совместно клонированные из хромосомальной ДНК *A. logei* Skal; целевой ген предполагается клонировать после рамки считывания гена *luxI*, формируя таким образом оперон из 2 генов. pIR-DPA1 — вектор, полученный путем встраивания дополнительного LuxR2-регулируемого промотора перед сайтами для клонирования гена интереса, т. е. последний транскрибируется с 2 промоторов (1 общий с геном *luxI* и 1 собственный). Второй промотор содержит симметризованную последовательность *lux*-бокс. Такая конструкция позволяет усилить экспрессию целевого гена. pR-DPA1 отличается отсутствием гена *luxI*, в остальном такой же, как pIR-DPA1. Без гена *luxI* не происходит синтеза АИ клетками *E. coli*, трансформированными экспрессионным вектором, и аутоиндукция отсутствует.

Полученные векторы позволяют осуществлять температурно-переключаемый аутоиндуктор-регулируемый биосинтез целевого белка в клетках *E. coli*. Все тестовые ферментации проводились с помощью штамма *E. coli* MC1061. Эксперименты с использованием гена *gfp* в качестве целевого показали следующее:

- 1) в присутствии в культивационной среде АИ экспрессия целевого гена начинается при снижении температуры до 20–22 °С и прекращается при повышении до 37 °С (см. рисунок);
- 2) при сниженной температуре уровень экспрессии целевого гена зависит от концентрации АИ (дозо-зависимость сохраняется в диапазоне от 1 нМ до 10 мкМ);
- 3) наличие гена *luxI* обеспечивает синтез эндогенного АИ и, таким образом, аутоиндукцию (см. рисунок), однако белок LuxI при индукции в клетках в заметном количестве не накапливается (не наблюдается появления соответствующей полосы при белковом гель-электрофорезе);
- 4) при длительной индукции представленные экспрессионные векторы позволяют получать целевой белок до 35 % от общего клеточного белка.

Векторы pIRAls, pR-DPA1 и pIR-DPA1 с подробным описанием и нуклеотидными последовательностями представлены на сайте <https://nbp.biophystech.ru/>.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ МК-1164.2022.1.4  
© С. В. Баженов, Е. С. Щеглова, И. В. Манухов, 2022



Зависимость содержания белка GFP в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидами pIR-DPA1::gfp (*luxI*<sup>+</sup>) или pR-DPA1::gfp (*luxI*<sup>-</sup>), от времени в условиях культивации при переменной температуре.

При понижении температуры часть образцов была индуцирована путем добавления экзогенного AI в концентрации 1 мкМ. В качестве отрицательного контроля использовали клетки MC1061 pIR-DPA1

#### Литература

1. Choi S. H., Greenberg E. P. Genetic evidence for multimerization of LuxR, the transcriptional activator of *Vibrio fischeri* luminescence // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1992. Vol. 1. P. 408–413.
2. Khrulnova S. A., Baranova A., Bazhenov S. V et al. Lux-operon of the marine psychrophilic bacterium *Aliivibrio logei*: a comparative analysis of the LuxR1/LuxR2 regulatory activity in *Escherichia coli* cells // Microbiol. 2016. Vol. 162. P. 717–724.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ *METHYLORUBRUM EXTORQUENS* pCM160 ПО ОТНОШЕНИЮ К МЕТАНОЛУ, ЭТАНОЛУ И ФОРМАЛЬДЕГИДУ\*

С. П. Баклагина, С. В. Алферов

*Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, Научно-исследовательский центр «БиоХимТех»,  
Тульский государственный университет*

✉ sofiabaklagina@gmail.com

### Аннотация

В ходе определения кинетических параметров фермента МДГ *M. extorquens* pCM160 установлено, что его сродство к метанолу выше, чем к этанолу и формальдегиду. При сравнении с базой данных BRENDA показано, что полученное значение  $K_M$  для метанола ( $K_M = 0,129 \pm 0,007$  мМ) согласуется с литературой ( $K_M = 0,105 \pm 0,050$  мМ) [1]. Данные для этанола и формальдегида представлены впервые.

Метилотрофы служат основными биологическими поглотителями метана и других метилированных парниковых газов, а также используются в качестве средств биоремедиации и производстве топлива и химикатов. Одним из распространенных метилотрофных организмов являются *Methylobacterium extorquens* бактерии, которые содержат фермент МДГ в доминирующем количестве. Семейство MxaF относится к наиболее распространенному типу фермента в окружающей среде, поэтому изучение его кинетических свойств является актуальной задачей.

Цель работы — изучение кинетических свойств фермента МДГ MxaF-типа.

В качестве материала для выделения белка использовали биомассу бактерий *M. extorquens* pCM160. Для определения активности фермента МДГ применяли спектрофотометрический метод по известной методике [2]. Концентрацию белка устанавливали по методу Бредфорда [3]. Выделение фермента МДГ проводили с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, основанной на образовании прочной связи белка с полигистидиновой меткой с комплексом никеля.

Кинетические параметры определяли по величине изменения удельной активности фермента в присутствии различных концентраций субстратов. В качестве субстратов использовали метанол, этанол и формальдегид (см. рисунок).

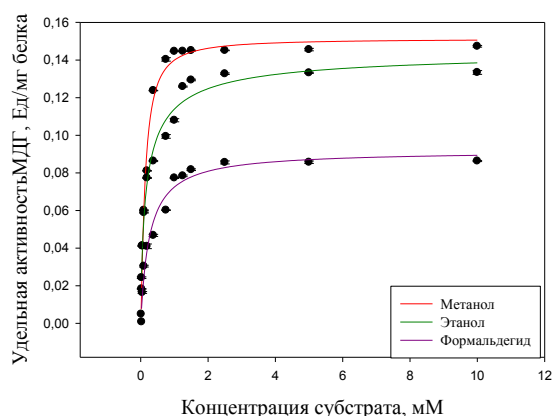


График зависимости удельной активности фермента МДГ *M. extorquens* pCM160 от концентрации метанола, этанола и формальдегида

Для описания кинетики ферментативных реакций использовали сигмоидальное уравнение Хилла, так как фермент МДГ MxaF-типа является тетраметром (структура  $\alpha_2\beta_2$ ), см. таблицу [4]. Молекулярные массы субъединиц определены с помощью SDS-ПААГ-электрофореза: 66 и 8,5 кДа соответственно.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в области научной деятельности проект № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

**Параметры уравнения Хилла для МДГ *M. extorquens* pCM160**

<b>Параметр</b>	<b>Метанол</b>	<b>Этанол</b>	<b>Формальдегид</b>
$V_{\max}$ , Ед/мг белка	0,151 ± 0,002	0,146 ± 0,005	0,092 ± 0,003
$K_M$ , мМ	0,129 ± 0,007	0,179 ± 0,003	0,260 ± 0,004
$h$	1,23 ± 0,07	0,740 ± 0,006	0,98 ± 0,01
$R^2$	0,9915	0,9770	0,9725

Видно, что максимальная скорость окисления для метанола и этанола находится практически на одинаковом уровне, за исключением значения для формальдегида.

Концентрация полунасыщения ( $K_M$ ) численно равна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости, и характеризует сродство фермента к данному субстрату. Как известно, чем меньше  $K_M$ , тем больше сродство фермента к субстрату и тем выше начальная скорость реакции. Данные таблицы демонстрируют зависимость повышения  $K_M$  с увеличением длины углеводородного радикала для алифатических спиртов.

Таким образом, в результате определения кинетических параметров фермента МДГ *M. extorquens* pCM160 определено, что сродство фермента МДГ к метанолу выше, чем к этанолу и формальдегиду.

#### **Литература**

1. BRENDA — The Comprehensive Enzyme Information System // Inf. EC 1.1.2.7 — Methanol Dehydrogenase (Cytochrome C) (дата обращения: 07.06.2022).
2. Day D. J., Anthony C. Methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 // *Methods Enzymol.* 1990. Vol. 188. P. 210–216.
3. Olson B.J.S.C. Assays for Determination of Protein Concentration // *Curr. Protoc. Pharmacols.* 2016. P. 73.
4. Afolabi P. R., Mohammed F., Amaratunga K. et al. Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome  $c_L$  // *Biochemistry.* 2001. Vol. 40. P. 9799–9809.

## РАЗРАБОТКА ПРИБОРА СО СМЕННЫМИ ГЕПАТОКАРТРИДЖАМИ ДЛЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

С. С. Бакуменко<sup>1</sup>, Б. А. Римская<sup>1</sup>, С. А. Щербина<sup>1</sup>, А. А. Аитова<sup>1</sup>, В. А. Цвеляя<sup>1,2</sup>, К. И. Агладзе<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Лаборатория биофизики возбудимых систем, Долгопрудный

<sup>2</sup>Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

✉ bakumenko.ss@phystech.edu

### Аннотация

Общепринятым на сегодняшний день методом лечения печеночной недостаточности является трансплантация печени [1]. Но он ограничен из-за дефицита доноров и высокой стоимости, что делает разработку альтернативных вспомогательных терапий актуальной. Разработан прототип устройства, выполняющего синтетические функции печени, что в перспективе позволит увеличить время ожидания трансплантации для пациентов.

Центральная задача проекта — разработка модельной системы заместительной терапии *ex vivo*, направленной на полноценное возмещение синтетической функции печени. В перспективе разрабатываемый прибор со сменными гепатокартриджами позволит компенсировать работу печени, сняв тем самым нагрузку с собственного органа пациента. Данный метод поддерживающей терапии будет также актуален для пациентов, которые находятся в ожидании трансплантации.

Процесс разработки прибора условно разделен на две части: создание и последующее исследование эффективности работы гепатокартриджей и настройка системы перфузии. В ходе данной работы выделение первичной культуры гепатоцитов осуществлялось по соответствующему протоколу методом ферментативной перфузии [2]. Протокол был оптимизирован с целью повышения среднего показателя количества клеток и увеличения их выживаемости. Варьировалось содержание инсулина и гепарина, изменены объемы перфузата и время ферментации. Также подобраны и протестированы различные адгезивные подложки, в частности полимерные волокна (рис. 1) и матриксы животного происхождения.

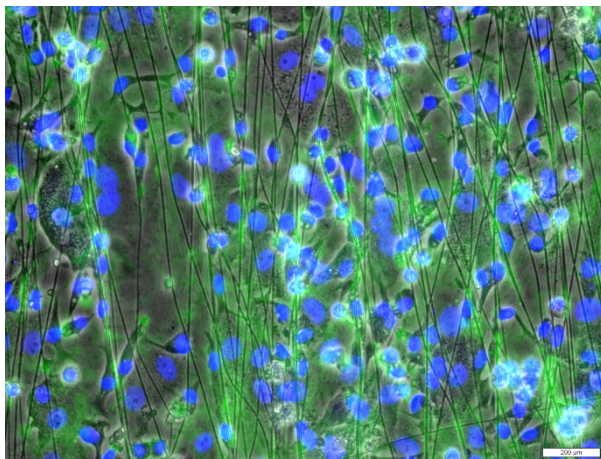


Рис. 1. Гепатоциты на полимерных волокнах. Ядра окрашены синим (DAPI), метки F-актина — зеленым

В качестве основного маркера нормального функционирования гепатоцитов выбран альбумин как основной белок, синтезируемый клетками печени [3]. Для исследования динамики выработки альбумина в окружающую клеточную среду проводился спектрофотометрический анализ растворов, которые накапливали ALB в течение всего периода культивации (до 25 дней). По результатам спектрофотометрического анализа рассчитаны средние показатели скорости продукции ALB на единицу массы. Наилучший результат отмечается при культивировании на подложке из желатина: в среднем в день на 1 млн клеток синтезируется 3204 мкг/мл альбумина.

Следующий этап заключался в описании возможных конструкций картриджа. В качестве первых прототипов выбраны следующие модели: модель проточных трубок, гепатофильтр (рис. 2) и объединенная модель проточных трубок с боковым гидрогелевым гепатофильтром. Для первой модели характерна структуризация гепатоцитов вдоль трубки и непрямая диффузия потока, а для гепатофильтра — фильтрация через структуру гепатоци-



тов. Перфузия осуществляется перпендикулярно структуре волокон с клетками. В результате прокачивания через первую модель проточной трубки с волокнами оптимальная скорость прокачки, при которой не происходит отрыва волокон от PDMS, — 10 мл/мин. Для гепатофильтра аналогичная скорость была ниже и составляла 5 мл/мин, что дает преимущество первому прототипу.

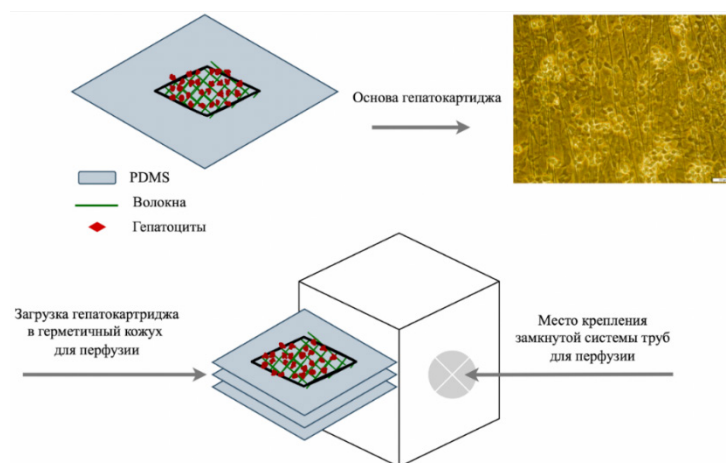


Рис. 2. Модель гепатофильтра. Полученные методом электроспиннинга полимерные волокна наносятся на соответствующую форму из PDMS. Гепатоциты имплантируются непосредственно на волокна и помещаются в кожух, через который производится последующая перфузия

В дальнейшем разрабатываемое устройство с гепатокартриджами будет подключаться к животному с печеночной недостаточностью для проверки на функциональную эффективность метода при заместительной печеночной терапии.

### Литература

1. Merion R. M. et al. The survival benefit of liver transplantation // Am. J. Transplantation. 2005. Т. 5, № 2. С. 307–313.
2. Shen L. et al. Isolation and primary culture of rat hepatic cells // J. Visualized Exp. 2012. № 64. P. e3917
3. Gekle M. Renal tubule albumin transport // Annu. Rev. Physiol. 2005. Vol. 67. P. 573–594.

## РАЗРАБОТКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ\*

А. С. Безруков, Л. В. Устюжанинова

Вятский государственный университет, Киров

✉ stud123663@vyatsu.ru

### Аннотация

Проведен скрининг азотфиксирующих бактерий по активности азотфиксации и синтеза ауксинов. Для дальнейшей работы выбраны 5 самых активных изолятов. Из коллекции кафедры было взято 3 штамма рода *Bacillus*, обладающие антагонистической активностью против фитопатогенов, и проверено их влияние на выбранные изоляты азотфиксаторов для определения возможности совместного культивирования.

В наши дни остро стоит проблема нехватки продуктов питания в результате порчи сельхозугодий и снижения урожайности. В этом случае может помочь безопасное комплексное бактериальное удобрение на основе азотфиксаторов, антагонистов фитопатогенов и продуцентов фитогормонов.

Для проведения скрининга использовались выделенные ранее азотфиксирующие бактерии. Для количественной оценки азотфиксирующей активности исследуемые изоляты засеивали на жидкую среду Эшби и культивировали в термостат при температуре 25 °С 7 суток. После ферментации в культуральной жидкости определяли содержание аммиачного азота фотоколориметрическим методом после реакции с реактивом Несслера [1]. Результаты по самым активным штаммам представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Количественный анализ азотфиксирующей активности**

Маркировка штаммов	Оптическая плотность	Концентрация азота в пересчете на NH <sub>4</sub> OH, мг/л
К2, N5, Реру, Котел, N7	1,033	282
4 цик. 3.1 N8	1,060	287
ЗКБР <sub>кор</sub>	1,437	407
10м-Бт	1,336	378
Морк. 4.1.1	1,436	406
1-Бт 2	1,582	450

Далее провели оценку активности синтеза ауксинов. Количественное содержание ауксинов определяли фотоколориметрическим методом с помощью реактива Сальковского [2]. Выбранные изоляты культивировали на 4 питательных средах, содержащих разные источники предшественника ауксинов — триптофана [3], при температуре 25 °С 4 суток. Выход ауксинов был выше на средах с дрожжевым экстрактом (табл. 2), а наиболее активными из исследуемых культур оказались штаммы 10м-Бт, 4 цик. 3.1 N8 и ЗКБР<sub>кор</sub>.

Таблица 2

**Оценка активности синтеза ауксинов**

Маркировка штаммов	Концентрация ауксинов после ферментации на разных средах, мг/л			
	Жидкая среда Эшби с измельченной скорлупой	Жидкая среда Эшби с дрожжевым экстрактом	Среда с дрожжевым экстрактом	Среда с кукурузным экстрактом
<i>B. amyloliquefaciens</i> БАЦ-3	2,1	2,2	13,7	2,1
<i>B. subtilis</i> КН	0,4	5,5	14,7	2,5
<i>B. subtilis</i> М-22	2,6	2,8	18,8	5,2
4 цик. 3.1 N8	1,5	23,3	11,8	4,9
Морк. 4.1.1	4,4	12,7	2,0	8,0
10м-Бт	1,8	10,1	34,9	13,8
ЗКБР <sub>кор</sub>	3,8	17,1	11,3	6,4

\* Исследование проводится при поддержке Фонда содействия инновациям (договор № 0074460).  
© А. С. Безруков, Л. В. Устюжанинова, 2022

Для определения возможности совместного культивирования бактерий исследовали антагонистическую активность антагонистов фитопатогенов, принадлежащих к роду *Bacillus*, взятых из коллекции кафедры (см. табл. 2), и выбранных штаммов азотфиксаторов (10м-БТ, ЗКБР<sub>кор</sub>, Морк. 4.1.1, 1-Бт2, 4 цик. 3.1 N8). Использовали метод перпендикулярных штрихов [4]. Культивирование проводили на полусинтетической агаризованной среде № 2 для бацилл [4] в термостате при температуре 25 °С в течение 2 суток. Штамм *B. subtilis* М-22 проявил высокую антагонистическую активность по отношению к большей части взятых азотфиксаторов.

В результате исследования для дальнейшей работы выбраны изоляты азотфиксаторов 10м-БТ, ЗКБР<sub>кор</sub>, Морк. 4.1.1, 1-Бт2 и 4 цик. 3.1 N8.

### Литература

1. Ляпустин А. В. Исследование процесса глубинного культивирования аэробных микроорганизмов: метод. указания к лабораторной работе 1. Киров, 1999. 38 с.
2. Микробные препараты на основе эндофитных и ризобактерий, которые перспективны для повышения продуктивности и эффективности использования минеральных удобрений у ярового ячменя (*Hordeum vulgare L.*) и овощных культур. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobnye-preparaty-na-osnove-endofitnyh-i-rizobakteriy-kotorye-perspektivny-dlya-povysheniya-produktivnosti-i-effektivnosti>.
3. Лубянова А. Р. Взаимодействие сигнальных путей при формировании защитных реакций растений в ответ на стрессовые факторы окружающей среды // Физиология растений. 2021. Т. 68, № 6. С. 563–578.
4. Устюжанинова Л. В., Фоминых Ю. А., Вятер В. А. Экспериментальное обоснование выбора питательной сред для ферментации бактерий рода *Bacillus* с целью получения биопрепарата // Общество. Наука. Инновации (НПК-2021): сб. ст. XXI Всерос. науч.-практ. конф. 12–30 апр. 2021 г.: 2 т. Киров: Вят. гос. ун-т. 2021. 123–128 с. Т. 2. Хим.-биол., технич., компьютерные науки и науки о Земле. URL: <http://vestnik43.ru/assets/mgr/docs/conferences/NPK-2021-tom-2.pdf>.

## АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕЗАВИСИМЫХ ПАРАМЕТРОВ НА ПРОДУКЦИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ЛОСЯ ДРОЖЖАМИ *KLUYVEROMYCES LACTIS*\*

Е. А. Белаш<sup>1</sup>, П. В. Колосов<sup>1</sup>, Д. В. Балабова<sup>1</sup>, С. В. Беленькая<sup>2</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ ekaterina.belash1@gmail.com

### Аннотация

Для оценки влияния независимых параметров (температура, концентрация глюкозы, скорость перемешивания) на выход рекомбинантного химозина лося в дрожжах *Kluyveromyces lactis* проведен полный факторный эксперимент типа  $2^k$ . В результате эксперимента определены наиболее значимые индивидуальные факторы и их взаимные сочетания, влияющие на параметр отклика — молокосвертывающую активность.

*Kluyveromyces lactis* — это аскомицетовые дрожжи, которые имеют долгую историю исследований в биотехнологии. В настоящее время описано получение более 100 белков, включая химозин в данной системе экспрессии [1]. Использование *K. lactis* как штамма-продуцента гетерологичных белков требует оптимизации условий культивирования, а также изучения факторов, влияющих на этот процесс. Полный факторный эксперимент позволяет решать разнообразные задачи по поиску оптимальных условий, выбора главных факторов, влияющих на изучаемый процесс, а также предоставляет математическую модель процесса и дает определиться с дальнейшей стратегией проведения эксперимента.

Цель данного исследования — изучение влияния факторов на процесс накопления рекомбинантного химозина лося в культуральной среде при культивировании рекомбинантного штамма дрожжей *K. lactis* с помощью полного факторного эксперимента типа  $2^k$ .

В работе использован рекомбинантный штамм *K. lactis*, содержащий экспрессионную кассету с геном прохимозина лося, под контролем конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Для культивирования клеток *K. lactis* и наработки белка применяли жидкую питательную среду YPD [2]. Уровень секреции рекомбинантного химозина (рХн) лося оценивали путем измерения молокосвертывающей активности (МА) культуральной жидкости.

Из литературных источников [2–4] и результатов предварительных опытов установлено, что на уровень секреции рХн лося в дрожжах *K. lactis* оказывают влияние следующие факторы:

- температура культивирования (Т), °С — фактор  $X_1$ ;
- концентрация глюкозы в питательной среде ( $C_{Glu}$ ), % — фактор  $X_2$ ;
- скорость перемешивания — фактор аэрации (RPM), об/мин — фактор  $X_3$ .

С учетом предварительных опытов выбран центр плана:  $X_1$  — 30 °С,  $X_2$  — 2 %,  $X_3$  — 265 об/мин. Интервал варьирования для  $X_1$  составил 5 °С,  $X_2$  — 1 %,  $X_3$  — 15 об/мин. Количество опытов  $N$  определяли по количеству факторов  $k$  в соответствии с выражением  $N = 2^k = 2^3 = 8$ .

После реализации полного факторного эксперимента строили линейную математическую модель вида:  $y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_0$ , где  $b_i$  — коэффициенты регрессии. Для расчета коэффициентов регрессии этой математической модели построили расширенную матрицу планирования и результатов опытов (табл. 1).

Таблица 1

**Матрица планирования и результаты опытов**

№ оп.	x0	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x3	T, °C	CGlu, %	RPM, об/мин	МА, УЕ/мл
1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	25	1	280	121,70
2	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	25	3	280	177,80
3	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	35	1	280	74,03
4	1	1	1	1	1	1	1	1	35	3	280	66,80
5	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	25	1	250	136,00

\* Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FZMW-2020-0002, «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия»).

© Е. А. Белаш, П. В. Колосов, Д. В. Балабова, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков, 2022

Окончание табл. 1

6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	25	3	250	208,90
7	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	35	1	250	70,70
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	35	3	250	63,80

Далее найдены значения коэффициентов регрессии (табл. 2) по следующей формуле:

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ji} \times y_i,$$

где  $j = 0, 1, \dots, k$ .

Таблица 2

### Коэффициенты регрессии

b0	b1	b2	b3	b12	b13	b23	b123
115	-369	115	-39	-143	52	-17	16

Коэффициенты при независимых переменных указывают на степень влияния факторов. Исходя из этого, выявлено, что больше всего на наработку рХн лося влияет температура культивирования дрожжей, причем при повышении температуры в диапазоне 25–35 °С МА должна уменьшаться. Также значимым фактором оказалась концентрация глюкозы в питательной среде: при повышении с 1 до 3 % МА должна увеличиваться. Можно предположить, что для роста выхода рХн необходимо повышать концентрацию глюкозы в питательной среде и при этом понижать температуру культивирования. Скорость перемешивания оказывает наименьшее влияние на выход рХн лося.

На основании вычислений получили следующий общий вид линейного уравнения регрессии:  $MA = -369 \times T + 115 \times C_{Glu} - 39 \times RPM - 143 \times T \times C_{Glu} + 52 \times T \times RPM - 17 \times C_{Glu} \times RPM + 16 \times T \times C_{Glu} \times RPM + 115$ .

### Литература

1. Chuzel L., Ganatra M. B., Schermerhorn K. M. et al. Complete genome sequence of *Kluyveromyces lactis* strain GG799, a common yeast host for heterologous protein expression // Genome Announc. 2017. Vol. 5. P. 1–2.
2. Беленькая С. В., Ельчанинов В. В., Щербаков Д. Н. Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* // Биотехнология. 2021. Т. 37 (5). С. 20–27.
3. Sakhtah H., Behler J., Ali-Reynolds A. et al. A novel regulated hybrid promoter that permits autoinduction of heterologous protein expression in *Kluyveromyces lactis* // Appl. Environ. Microbiol. 2019. Vol. 85. P. 1–12.
4. Feng Z., Zhang H., Zhang Y. et al. Optimization of medium composition for production of recombinant calf chymosin from *Kluyveromyces lactis* in submerged fermentation // J. Northeast Agric. Univ. (English Ed.) 2011. Vol. 18. P. 56–62.

## РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРАЛА И АПРОБАЦИЯ ПОЛУЧЕННОГО ФЕРМЕНТА ПРИ ВЫРАБОТКЕ СЫРА \*

С. В. Беленькая<sup>1</sup>, А. Д. Коваль<sup>2</sup>, В. В. Ельчанинов<sup>2</sup>, А. Н. Белов<sup>2</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул

<sup>3</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул

✉ belenkaya.sveta@gmail.com

### Аннотация

Исследование посвящено разработке и оптимизации условий культивирования дрожжевого продуцента рекомбинантного химозина марала. Приведены результаты апробации целевого фермента в качестве коагулянта молока при выработке сыра в производственных условиях.

Химозин (Хн) (ЕС 3.4.23.4) — аспарагиновая пепсиноподобная протеаза, основной действующий агент сычужного фермента, традиционно используемого в качестве коагулянта молока при производстве сыра. Долгое время по совокупности технологических свойств химозин коровы считался эталонным молокосвертывающим ферментом для сыроделия. Однако современные методы геной инженерии многократно расширяют сырьевую базу молокосвертывающих ферментов и позволяют получать рекомбинантные химозины (рХн) любых видов млекопитающих, не ограничиваясь только широко распространенными сельскохозяйственными животными.

Для получения рекомбинантных химозинов апробирован ряд экспрессионных систем: грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* [1–3], грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* [4], а также дрожжевые системы *Komagataella phaffii*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluuyveromyces lactis* [5].

Цель исследования — разработка штамма-продуцента рХн марала на основе молочных дрожжей *K. lactis* и апробация полученного рекомбинантного фермента в качестве коагулянта молока при выработке сыра в условиях промышленного производства.

На этапе выбора промотора сравнивали три различные конструкции, содержащие: гибридный промотор Р350, промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAP) и промотор фактора элонгации трансляции (TEF). В серии предварительных экспериментов показано, что наибольший выход целевого фермента достигается с промотором GAP. В ходе последующей оптимизации условий культивирования (состав питательной среды, температура и интенсивность перемешивания) молокосвертывающая активность рХн марала в культуральной жидкости увеличилась на 40 %: с 250 до 350 УЕ/мл.

Сравнительный анализ основных технологических свойств рХн марала, полученного при помощи сконструированного продуцента, и коммерческого препарата рХн коровы показал, что специфичность рХн марала ниже, чем у коровы, однако фермент марала обладает исключительной термолабильностью и превосходит коровий рХн по чувствительности к концентрации  $Ca^{2+}$  и изменению рН в молочном субстрате.

Производственная апробация рХн марала продемонстрировала, что его исключительная термолабильность способна компенсировать недостатки, связанные с высокой общей ПА. Сыры, выработанные с применением рХн марала и коммерческого препарата рХн коровы, имели близкие физико-химические, биохимические и органолептические показатели (табл. 1, 2). Следовательно, рХн марала, полученный в системе продукции *K. lactis*, может использоваться для промышленного производства сыров.

Таблица 1

**Некоторые физико-химические и биохимические параметры контрольных и опытных сыров после 45 суток созревания**

Образец сыра	Жир в сухом веществе, %	рН сырной массы, ед.	Общий растворимый N, %	N полипептидов и низкомолекулярных азотистых соединений, %	ЛЖК, мг %
Опыт (рХн марала)	49,98 ± 0,30	5,35 ± 0,01	28,74 ± 0,82	14,39 ± 0,34	13,10 ± 0,01
Контроль (рХн коровы)	50,81 ± 0,49	5,27 ± 0,01	26,02 ± 0,26	14,86 ± 0,10	10,30 ± 0,01

\* Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ FZMW-2020-0002 — «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия»).

© С. В. Беленькая, А. Д. Коваль, В. В. Ельчанинов, А. Н. Белов, Д. Н. Щербаков, 2022

Таблица 2

**Органолептическая оценка зрелых контрольных и опытных сыров, баллы**

Образец сыра	Вкус и запах	Консистенция	Рисунок	Цвет и упаковка (условно)	Общий балл
Опыт (рХн марала)	42,0	23,2	9,7	20,0	94,9
Контроль (рХн коровы)	41,7	23,3	9,8	20,0	94,8

Таким образом, на основе молочных дрожжей *K.lactis* разработан продуцент рХн марала и оптимизированы условия его культивирования, обеспечивающие получение препаратов целевого фермента с активностью 350 УЕ/мл. Сыры, выработанные в производственных условиях с рХн марала и коммерческим рХн коровы, сопоставимы по физико-химическим, биохимическим и органолептическим показателям.

**Литература**

1. Flamm E. L. How FDA Approved Chymosin: A Case History // Nat. Biotechnol. 1991. Vol. 9 (4). P. 349–351.
2. Filkin S. Y., Chertova N. V., Zatsepin S. S. et al. Production of Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*) Chymosin in the Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii* and Characteristics of the Recombinant Enzyme // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Vol. 57 (3). P. 297–302.
3. Belenkaya S. V., Shcherbakov D. N., Balabova D. V. et al. Production of Maral (*Cervus elaphus sibiricus* Severtzov) Recombinant Chymosin in the Prokaryotic Expression System and the Study of the Aggregate of Its Biochemical Properties Relevant for the Cheese-Making Industry // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. Vol. 56 (6). P. 647–656.
4. Parente D., de Ferra F., Galli G., Grandi G. Prochymosin expression in *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Lett. 1991. Vol. 77 (2, 3). P. 243–250.
5. Uniacke-Lowe T., Fox P. F. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties // Fourth Ed. Elsevier Ltd. 2017.

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ

Д. А. Белов

*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

✉ belov.da@list.ru

### Аннотация

В работе рассмотрены четыре основные области применения метода плавления ДНК высокого разрешения: геномное сканирование, генотипирование, сопоставление последовательностей и эпигенетические исследования.

Физический процесс плавления молекулы ДНК, возникающий при изменении ее температуры, связан с процессом перехода состояний «спираль — клубок» и сопровождается значительным изменением физических свойств исследуемого раствора ДНК, таких как вязкость и поглощение в ультрафиолетовой области излучения. Метод плавления ДНК высокого разрешения (HRMA) реализуется на детектирующих амплификаторах после проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением флуоресцентных красителей. Кривые плавления продуктов амплификации представляют собой зависимость интенсивности флуоресценции от температуры образца и отличаются друг от друга формой и значением температуры плавления  $T_m$ , что позволяет определять различия во фрагментах ДНК по их составу, длине и статусу метилирования. Такие преимущества метода, как скорость, простота, дешевизна, отсутствие контаминации и деградации пробы, способствовали внедрению метода во множество областей.

HRMA является общепринятым методом для геномного сканирования и позволяет обнаруживать гетеродуплексы по изменению формы кривой плавления. Например, уникальной формой кривой характеризуются 93 % гетерозигот *CFTR* [1]. На основе результатов анализа отбираются образцы для дальнейшего секвенирования. HRMA способен выявлять и гомозиготные изменения значений  $T_m$  с чувствительностью обнаружения, превышающей 92,9 % [2].

HRMA широко используется для генотипирования и позволяет окончательно идентифицировать гомозиготные и гетерозиготные варианты, которые не были выявлены при геномном сканировании. Для различных одонуклеотидных полиморфизмов (SNP) характерны изменения температуры плавления. Например, SNP, наблюдаемые у устойчивых штаммов *M. tb*, приводят к температурным отклонениям в диапазоне от < 0,1 до 1,4 К [3].

Возможность легко сопоставлять идентичные последовательности ДНК без информации о конкретном генотипе может значительно сэкономить ресурсы, заменив обременительную задачу полного генотипирования или секвенирования. Например, HRMA можно использовать для подбора трансплантатов в семьях, где вероятность идентичности родных братьев и сестер по локусу HLA составляет 25 % [4].

Применение HRMA в области эпигенетических исследований реализуется за счет предварительной обработки ДНК бисульфитом, которая обеспечивает разный базовый состав между метилированной и неметилированной ДНК. Метод позволяет определять статус метилирования от 0,1 % даже в образцах деградированной ДНК [5] и широко используется для выявления различных биомаркеров.

Для реализации метода созданы специальное оборудование, программное обеспечение и реагенты. Анализ HRMA стоит 0,3 долл. США за реакцию, но микрофлюидная реализация метода снизит стоимость реагентов примерно на три порядка [6]. Актуальным является развитие метода HRMA и широкое внедрение в практических задачах.

### Литература

1. Montgomery J., Wittwer C. T., Kent J., Zhou L. Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting Analysis // Clin. Chem. 2007. Vol. 53 (11). P. 1891–1898.
2. Van Der Stoep N., van Paridon C. D., Janssens T. et al. Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner // Hum. Mutat. 2009. Vol. 30 (6). P. 899–909.
3. Pholwat S., Liu J., Stroup S. et al. Integrated microfluidic card with TaqMan probes and high-resolution melt analysis to detect tuberculosis drug resistance mutations across 10 genes // mBio. 2015. Vol. 6 (2). e02273.
4. Zhou L., Vandersteen J., Wang L. et al. High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity // Tissue Antigens. 2004. Vol. 64 (2). P. 156–164.
5. Kristensen L. S., Wojdacz T. K., Thestrup B. B. et al. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM // BMC Cancer. 2009. Vol. 9. 453.
6. Ong D. C., Yam W.-C., Siu G. K., Lee A. S. Rapid detection of rifampicin-and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis by high-resolution melting analysis // J. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48. P. 1047–54.



## ОБНАРУЖЕНИЕ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ 16S РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК *ESCHERICHIA COLI* И ГЕНА *HigA1 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ БИНАРНЫХ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ

М. Ю. Березовская, Д. А. Горбенко

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

✉ berezovskaya@scamt-itmo.ru

### Аннотация

Анализ нуклеиновых кислот — один из самых перспективных подходов в современной диагностике. В данной работе предлагается метод для обнаружения бактериальных инфекций с использованием бинарных гибридационных зондов без амплификации. Предложенный биосенсор состоит из молекулярного зонда и двух ДНК цепей, комплементарных к молекулярному зонду и анализируемой нуклеиновой кислоте. С помощью этого сенсора обнаружены *Escherichia Coli* и *Mycobacterium tuberculosis*.

Ранняя диагностика инфекционных заболеваний необходима для своевременного начала терапии. Существует множество способов диагностики бактериальных патогенов, такие как культуральный метод или полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, однако в большинстве случаев они либо слишком продолжительные (культуральный метод), либо требуют дорогостоящего оборудования, такого как амплификатор для ПЦР. Анализ нуклеиновых кислот — базовый принцип диагностики патогенных инфекций. На сегодняшний момент необходимы системы РОСТ (*point-of-care testing*), которые могут быть доступны в условиях отсутствия обученного персонала и специального оборудования, такого как количественная ПЦР. Ввиду этого применение новой концепции биосенсоров может быть разумным решением.

В данной работе бинарные гибридационные ДНК-зонды использованы для обнаружения фрагмента 16S рибосомальной РНК и фрагмента ДНК *M. Tuberculosis* (ген *HigA1*), отвечающего за обретение антибиотикорезистентности. В качестве модельных микроорганизмов выбран *Escherichia Coli*, так как он является условно патогенным микроорганизмом, способным вызывать тяжелое пищевое отравление, гемолитический уремиический синдром, и *Mycobacterium tuberculosis*, так как туберкулез является одной из 10 основных причин смерти и главной причиной смерти, обусловленной каким-либо одним возбудителем инфекции (опережая ВИЧ/СПИД).

Благодаря своей структуре стержневой петли гибридационный зонд имеет повышенную селективность, которую обеспечивает «длинное» аналит-связывающее плечо, и способен распознавать даже однонуклеотидные замены (обеспечивается «коротким», нарушающим формирование комплекса плечом). В основе используемой в работе тест-системы лежит конструкция, состоящая из двух цепей ДНК и гибридационного зонда с флуоресцентным F-субстратом на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце (МВ). Обе последовательности ДНК состоят из двух частей: комплементарной анализируемой нуклеиновой кислоты (аналит) и комплементарной МВ. При добавлении аналита формируется комплексная конструкция, в результате чего увеличивается флуоресцентный сигнал. В работе использовали F-субстрат с флуорофором FAM. Реакцию проводили в присутствии 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ Tris pH 7,5. После инкубирования смеси 40 мин в водяной бане при температуре 23 °С уровень флуоресценции измеряли на флуориметре Tecan. Показано, что предел обнаружения *Escherichia Coli* 0,5 нмоль, предел обнаружения *Mycobacterium tuberculosis* 0,7 нмоль.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ И КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ОБРАЗОВАНИЯ БИОВОДОРОДА \*

П. Д. Бирючкова<sup>1</sup>, Ю. В. Литти<sup>2</sup>, Э. Р. Михеева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина

<sup>2</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

<sup>3</sup>Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

✉ poly2307@bk.ru

### Аннотация

Цель данной работы — исследование влияния различных форм металлов на характеристики процесса темновой ферментации (ТФ) молочной сыворотки с получением биоводорода.

В настоящее время особую актуальность представляют исследования в области возобновляемых источников энергии, среди которых молекулярный водород ( $H_2$ ) имеет значительный потенциал. Производство био- $H_2$  из различных органических отходов с использованием процесса ТФ, помимо получения энергии, позволяет снизить антропогенную нагрузку на природу. Активным центром ферментов, регулирующих водородный обмен (гидрогеназ), являются Fe и Ni. Сообщается о повышении эффективности процесса ТФ в присутствии наночастиц металлов [1]. Однако недостаточно изученным остается влияние степени окисления металла (нулевая валентность, оксиды, ионы) на процесс ТФ.

Эксперимент проводился в периодических реакторах при температуре 55 °С. В качестве субстрата использовалась молочная сыворотка (МС), в качестве инокулята — чистая культура термофильной анаэробной бактерии *Thermoanaerobacterium thermosaccharoliticum* SP-H2. Для увеличения активности гидрогеназ применялись магнетит, гематит, порошки железа ( $Fe^0$ ), никеля и кобальта,  $FeSO_4$ ,  $FeCl_3$ . Также МС обрабатывали в аппарате вихревого слоя (АВС). Принцип действия АВС состоит в комплексном электромагнитном, механическом и кавитационном воздействии на обрабатываемый субстрат за счет вихревого движения и соударения стальных игл во вращающемся магнитном поле [2]. За счет соударения игл в обрабатываемый субстрат попадают частицы стали, количество которых определяется в первую очередь временем обработки в АВС (в данной работе 5; 20; 45 и 90 с).

В таблице представлены кинетические параметры образования  $H_2$  с использованием модифицированного уравнения Гомперца в сравнении со степенью окисления железа. Лучший потенциальный выход водорода наблюдался у АВС45 (38,5 мл), магнетита (47,2 мл), порошков  $Fe^0$  (53,7 мл и 48,4 мл); максимальная скорость выхода  $H_2$  — у магнетита (104,2 мл) и Ni (880,2 мл); наименьшая лаг-фаза — у АВС90,  $FeSO_4$ . Гематит же характеризовался наименьшими потенциальным выходом  $H_2$  и максимальной скоростью его образования, а также наиболее продолжительной лаг-фазой.

Анализ с использованием коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между растворенными формами железа и кинетическими параметрами ТФ (см. таблицу) показал, что из двух форм железа концентрация  $Fe^{3+}$  положительно коррелировала со временем обработки в АВС и максимальной скоростью выхода  $H_2$  и отрицательно — с лаг-фазой. А концентрация  $Fe^{2+}$ , наоборот, не имела значимой корреляции с кинетическими параметрами процесса ТФ. Это подтверждалось и в образцах с добавлением растворимых солей железа ( $Fe^{3+}$  и  $Fe^{2+}$ ): при добавке  $FeCl_3$  водород образовывался интенсивнее, чем при  $FeSO_4$ .

### Кинетические параметры образования водорода в сравнении со степенью окисления железа

Добавленный материал / обработка	Потенциальный выход $H_2$ , мл	$Fe^{2+}$	$Fe^{3+}$	Максимальная скорость выхода $H_2$ , мл/сутки	Лаг-фаза, сутки
Контроль	29,7	–	–	6,9	0,80
АВС 5	30,0	4,5	3,6	66,0	0,45
АВС 20	34,7	1,7	6,9	55,6	0,33
<b>АВС 45</b>	<b>38,5</b>	23,1	1,5	52,2	0,38
<b>АВС 90</b>	26,9	15,2	4,7	9,1	<b>0</b>
Магнетит ( $FeO \cdot Fe_2O_3$ )	47,2	50,4	7,3	<b>104,2</b>	0,49

\* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-79-10153, эксперименты с обработкой МС в АВС) и Минобрнауки РФ (эксперименты с внесением наночастиц металлов).

© П. Д. Бирючкова, Ю. В. Литти, Э. Р. Михеева, 2022

Окончание табл.

Гематит (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	7,4	1,1	0,2	0,7	1,38
Fe <sup>0</sup> ПЖРВ 4.071.26	53,7	31,4	25,7	41,0	0,32
Fe <sup>0</sup> ПЖРВ 2.200.28	48,4	52,5	32,5	58,7	0,41
Ni <sup>0</sup> ПНК УТ1	43,0	–	–	880,2	0,96
Co <sup>0</sup> ПК-1У	43,1	–	–	35,8	0,21
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30,4	44,4	8,6	14,4	0,10
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	43,4	7,8	12,7	44,6	0,18

Основные растворимые метаболиты — бутират, ацетат и этанол. На примере динамики образования растворимых метаболитов с добавлением порошка Fe<sup>0</sup>, МС, обработанной в АВС, магнетита можно сказать о прохождении смешанного ацетатно-бутиратного пути ТФ. Преимущественное образование бутирата, а не ацетата считается многими исследователями наиболее выгодным для образования H<sub>2</sub> метаболическим путем. Это коррелировало с более высоким выходом H<sub>2</sub> и его концентрацией в биогазе. При добавлении порошка Fe<sup>0</sup> и магнетита наблюдалось также выделение муравьиной кислоты. А при добавлении FeSO<sub>4</sub> шло интенсивное образование молочной кислоты, что отличает этот вид добавки от остальных. Очень низкий выход кислот при добавлении гематита говорит о его ингибировании процесса в использованных дозировках.

По совокупности параметров процесса ТФ порошки Fe<sup>0</sup>, магнетит, Ni, Co, а также растворенное железо (Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup>) и МС, обработанная в течение 45 с в АВС, являются оптимальными видами добавок.

#### Литература

1. Gadhe et al. Enhancement effect of hematite and nickel nanoparticles on biohydrogen production from dairy wastewater // Int. J. Hydrogen Energy. 2015. Т. 40, № 13. С. 4502–4511.
2. Литти Ю. В. и др. Использование аппарата вихревого слоя для повышения эффективности метанового сбраживания осадков сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. 2019. № 11. С. 32–40.

## ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА БАКТЕРИЙ *GLUCONOBACTER OXYDANS*\*

Д. А. Богачихин, Н. Ю. Юдина, Т. Н. Козлова

*Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии,  
Научно-исследовательский центр «БиоХимТех», Тульский государственный университет*

✉ danbogach99@gmail.com

### Аннотация

В данной работе рассматривается токсическое влияние ионов тяжелых металлов на бактерии *Gluconobacter oxydans*. Проведена оценка концентрации ионов  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , при которой достигается 50 % ингибирования дыхательной активности микроорганизмов ( $\text{EC}_{50}$ ). Показано, что для всех ионов  $\text{EC}_{50}$  значительно ниже, чем для систем, описанных ранее в литературе.

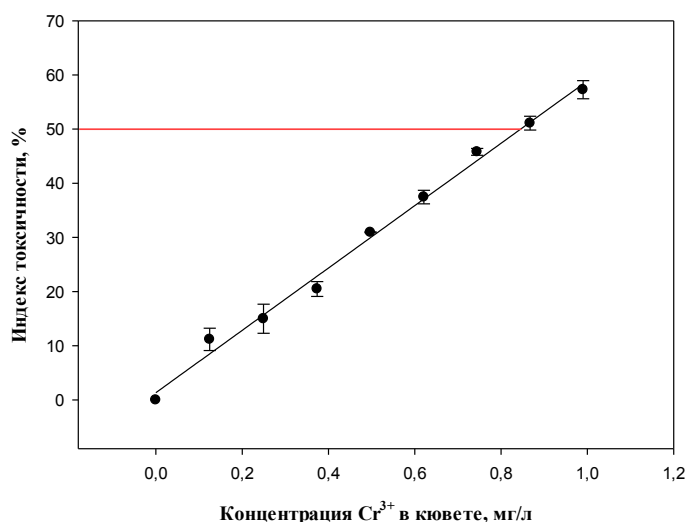
В настоящее время остро стоит вопрос о контроле содержания органических и неорганических токсикантов, поступающих в водоемы из различных источников, в том числе из сточных вод промышленных предприятий. Большое внимание уделяется токсическому влиянию ионов тяжелых металлов, так как они являются одними из наиболее опасных для живых организмов неорганических веществ ввиду своих физико-химических особенностей, в частности способности проникать сквозь клеточные мембраны и образовывать прочные соединения внутри и на поверхности клеток [1]. В связи с этим цель данной работы — формирование биосенсора на основе бактерий *G. oxydans* ВКМ В-1280 для оценки токсичности тяжелых металлов по ингибированию дыхательной активности.

Для формирования биосенсоров использовали угольно-пастовый электрод на основе медиатора ферроцена и бактерий *G. oxydans*, подключенный к потенциостату CORRTTEST. Для определения токсического эффекта в кювету вносили раствор соли тяжелого металла, дожидались установления стационара, добавляли раствор глюкозы и фиксировали ответ медиаторного биосенсора.

Для выявления токсического эффекта строили кривые концентрации токсиканта — индекс токсичности, описывающие процент ингибирования в зависимости от концентрации токсиканта (см. рисунок). Расчет производился по следующей формуле:

$$T = \frac{R_{\text{ГЛ}} - R_{\text{ГЛ+ТОКС}}}{R_{\text{ГЛ}}} \cdot 100\%,$$

где  $T$  — индекс токсичности, %;  $R_{\text{ГЛ}}$  — ответ биосенсора на добавление глюкозы,  $\text{мг O}_2/\text{дм}^3 \cdot \text{с}$ ;  $R_{\text{ГЛ+ТОКС}}$  — ответ биосенсора на глюкозу в присутствии токсиканта.



Зависимость индекса токсичности от концентрации хрома

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Для количественной оценки эффектов концентрацию, вызывающую процент ингибирования (например, 50 %), определяют как  $EC_x$  (например,  $EC_{50}$ ). Полученные значения  $EC_{50}$  для ряда тяжелых металлов (см. таблицу) оказались значительно ниже, чем для ранее описанных в литературе биосенсоров, что позволяет в дальнейшем использовать данную систему на основе бактерий *G. oxydans* для оценки токсичности тяжелых металлов.

#### Результаты определения токсичности ( $EC_{50}$ ) тяжелых металлов

Токсикант	$EC_{50 \text{ эксп}}^*$ мг/л	$EC_{50 \text{ лит}}^*$ мг/л	Ссылка
$Cd^{2+}$	$1,6 \pm 0,2$	79	[2]
$Fe^{2+}$	$7,8 \pm 0,3$	$10 \pm 1$	[3]
$Cr^{5+}$	$0,85 \pm 0,02$	29 – 52	[4]
$Zn^{2+}$	$2,35 \pm 0,07$	47,5	[5]
$Mn^{2+}$	$0,33 \pm 0,02$	56	[6]

#### Литература

1. Charkiewicz A. E., Backstrand J. R. Lead toxicity and pollution in Poland // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2020. T. 17, № 12. С. 4385.
2. Gao G., Qian J., Fang D. et al. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium // Anal. Chim. Acta. 2016. Vol. 924. P. 21–28.
3. Кондакова К. С., Дерябина Т. Д. Влияние ионов, нано- и микрочастиц железа на люминесценцию и рост рекомбинантного штамма *Escherichia coli* с клонированным *lux*-опероном *photobacterium leiognathi* в тесте острой и хронической токсичности // Нанотехника. 2012. № 4. С. 47–52.
4. Novelli A. A. et al. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the lagoon of Venice, Italy // Environ. Toxicol. Chem.: Int. J. 2003. T. 22, № 6. С. 1295–1301.
5. Kharkova A. S., Arlyapov V. A., Turovskaya A. D. et al. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity // Enzyme Microb. Technol. 2020. Vol. 132. P. 109435.
6. Sorvari J., Sillanpää M. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna* // Chemosphere. 1996. T. 33, № 6. С. 1119–1127.

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ХРОСОМОСНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ (ПГТ-А) МЕТОДОМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

М. А. Борисова<sup>1</sup>, К. Б. Игнатов<sup>1</sup>, М. С. Анисименко<sup>1</sup>,  
А. Ю. Гаранин<sup>1</sup>, Д. Н. Штокало<sup>2</sup>, М. Ю. Помазной<sup>2</sup>, С. П. Коваленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «ДНК-Дисплей», Новосибирск

<sup>2</sup>ООО «Новые программные системы», Новосибирск

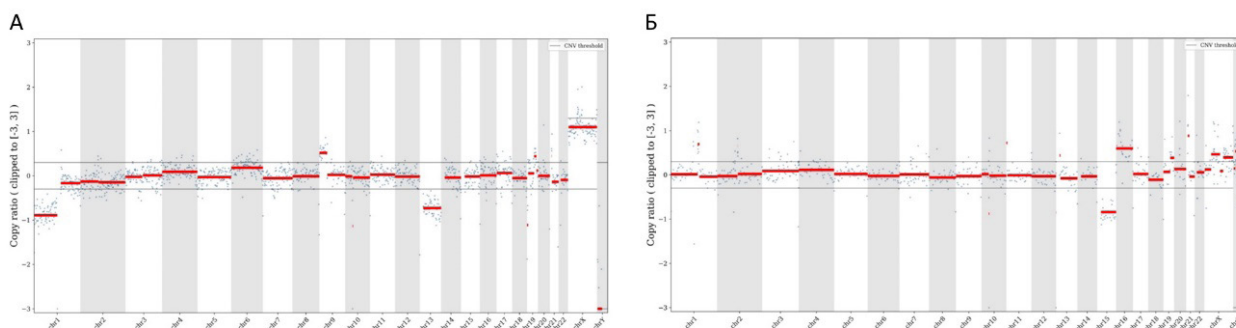
✉ mariazot@yandex.ru

### Аннотация

Разработана система для пробоподготовки и анализа доимплантационных эмбрионов с помощью NGS-секвенирования. Система включает полногеномную амплификацию, ферментативную фрагментацию, введение адаптеров с индексами, обогащение полученных библиотек и анализ данных с помощью программного обеспечения.

Проведение преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) в протоколах ЭКО позволяет отобрать для переноса в полость матки эмбрионы с нормальным хромосомным набором, что увеличивает вероятность наступления беременности, а также значительно снижает риск рождения детей с хромосомными патологиями после процедуры ЭКО. Самыми часто встречающимися патологиями доимплантационных эмбрионов являются анеуплоидии. Для их эффективного выявления используют методы массового параллельного секвенирования (NGS). Число проводимых процедур ЭКО ежегодно возрастает, в связи с чем очень актуально проведение ПГТ. Цель настоящей работы — создание системы для ПГТ-А, включающей полногеномную амплификацию ДНК, фрагментирование продуктов амплификации, введение индексов и адаптеров для секвенирования, анализ данных секвенирования с помощью программного обеспечения с выдачей заключения о результате тестирования.

Полногеномную амплификацию проводили с помощью улучшенной версии ПЦР с вырожденными праймерами. В качестве фермента использовали SD ДНК-полимеразу, представляющую собой мутантную форму Taq-полимеразы. В отличие от последней, SD-полимераза обладает мощной вытесняющей активностью, при этом у фермента отсутствует 5'-3'-экзонуклеазная активность. Фрагментацию продуктов полногеномной амплификации проводили с помощью комбинации ферментов: ДНКазы I и SD ДНК-полимеразы. ДНКазы I вносит одноцепочечные разрывы в исходную молекулу двуцепочечной ДНК. Вытесняющая активность SD ДНК-полимеразы позволяет достроить цепь ДНК с получением перекрывающихся последовательностей двуцепочечных фрагментов, имеющих 3'-А выступы на концах. Далее осуществляли T-A-лигирование полученных фрагментов с индексами и адаптерами с последующим обогащением. Полученные ДНК-библиотеки анализировали на приборе MiSeq (Illumina, США), а данные секвенирования (*fastq*-файлы) — с помощью разработанного программного обеспечения (*genomenal.ru*).



Фрагменты заключений, содержащие распределение полученных прочтений по хромосомам:

А — частичная моносомия 1-й хромосомы, частичная трисомия 9-й хромосомы, моносомия 13-й хромосомы;

Б — моносомия 15-й хромосомы, трисомия 16-й хромосомы

---

С использованием разработанной системы проведен анализ серии образцов ДНК, полученных от доноров с хромосомными аномалиями, из абортного материала и клеток эмбрионов. В результате анализа подтверждено наличие трисомии у доноров (21-я хромосома), выявлены трисомии в образцах из абортного материала (хромосомы 13, 16, 18, 22), моносомии (хромосомы 1, 2, 5, 11, 15, 17) и различные структурные аномалии в образцах клеток эмбрионов. Графики с данными по каждой хромосоме представлены на рисунке.

Разработана система для анализа анеуплоидий, включающая полногеномную амплификацию, ферментативную фрагментацию, добавление служебных последовательностей, обогащение полученных библиотек и анализ данных с помощью программного обеспечения.

## РАЗРАБОТКА ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОИНСУЛИНА ГЛАРГИН И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В БИОРЕАКТОРАХ

М. Д. Бочкарева, Д. А. Сеничкина, И. А. Корнаков, З. Р. Хасаншина, С. Э. Робустова, В. Ф. Латыпов

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

✉ mariia.bochkareva@geropharm.com

### Аннотация

Разработан штамм-продуцент проинсулина, позволяющий получать гибридный полипептид с высокой долей гларгина (49,5 %) и повышающий эффективность очистки целевого продукта за счет элиминации близкородственной примеси Arg0-A-гларгин. Максимизированы выходы белка в процессе ферментации с использованием статистического метода планирования экспериментов *Design of experiments* (DoE), в процессе выход белка увеличен более чем на 40 %.

По прогнозам *International Diabetes Federation*, число людей, живущих с диабетом, возрастет до 643 млн человек к 2030 г. Численность пациентов с сахарным диабетом в Российской Федерации уже в 2021 г. составила почти 5 млн человек (3,23 % населения РФ). Таким образом, с каждым годом повышается потребность в заместительной терапии инсулином и его аналогами. Большинству пациентов на постоянной основе необходимы инсулины пролонгированного действия, такие как НПХ или гларгин. Последний, согласно исследованиям, демонстрирует профиль активности в организме, гораздо более близкий к естественному, чем инсулин НПХ. Таким образом, разработка высокопродуктивных штаммов-продуцентов гларгина особенно актуальна.

**Цель** данной работы — разработка продуцента инсулина гларгин и увеличение выходов гибридного белка на этапе культивирования.

Проведен дизайн конструкций, обеспечивающих высокий уровень экспрессии гибридного белка и его накопление в виде нерастворимых телец включений, максимизированы выходы в процессе ферментации путем оптимизации состава стартовой среды и условий индукции с использованием статистического метода планирования экспериментов *Design of experiments* (DoE). Применение методологии DoE позволило реализовать рекомендованный подход ICH Q8 к разработке — «качество через разработку» (*Quality by design*), учитывающий взаимодействие параметров и ключевых показателей процесса.

### Генетическая конструкция

Преимуществом разработанной конструкции является наличие лидерного пептида, образующего пространственную структуру типа «альфа-спираль», что улучшает эффективность ренатурации гибридного полипептида и сохраняет стабильность гларгина в *E.Coli*. Обеспечена высокая доля инсулина гларгин в гибридном полипептиде (49,5 %) за счет минимизации лидерного пептида. Модификация сайта протеолиза между С-пептидом и А-цепью позволяет исключить образование близкородственной примеси Arg0-A-гларгин при ферментативном гидролизе продукта.

### Upstream

Проведена оптимизация процесса культивирования штамма-продуцента в колбах по DOE и валидация модели в биореакторе. По результатам исследований подобрана оптимальная среда на основе комплексного растительного пептона и дрожжевого экстракта, получены проектные поля и проведена валидация условий в лабораторном биореакторе объемом 3 л.

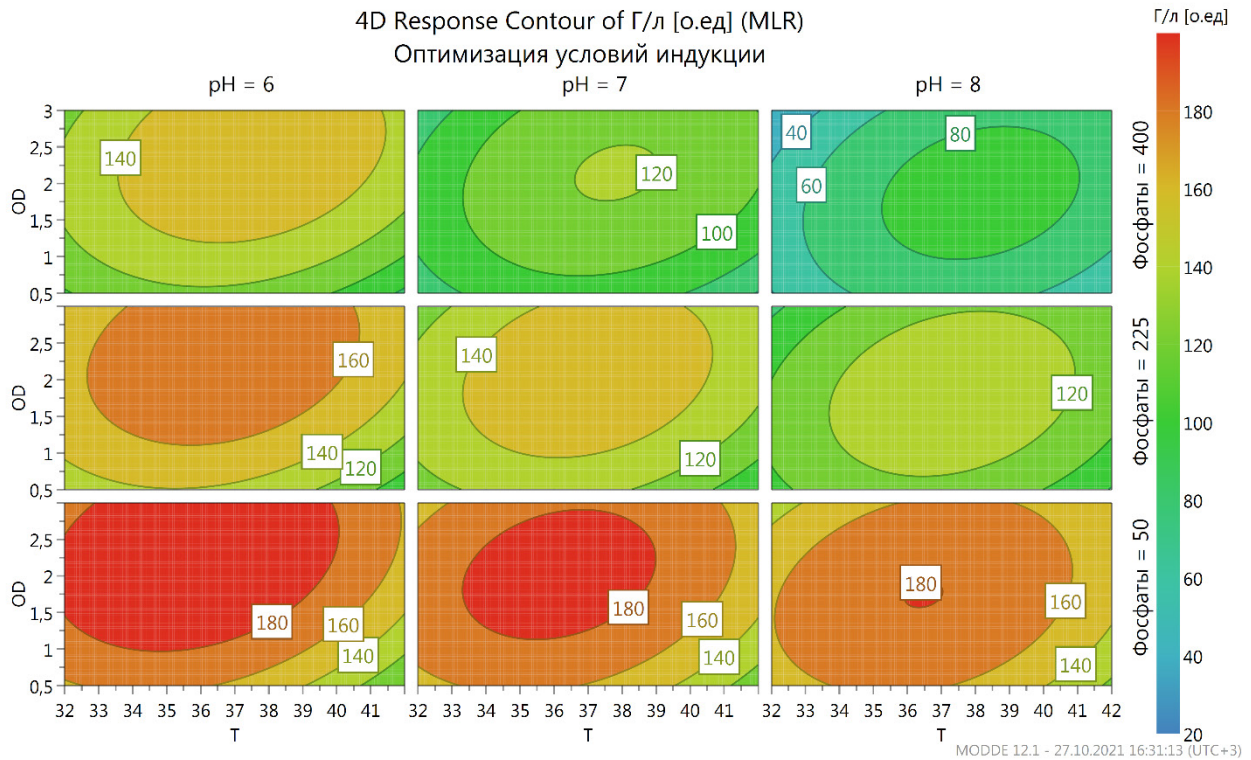
Оптимизацию условий индукции осуществляли в соответствии с дизайном *Reduced Central Composite Face* (см. рисунок). Модель предсказала максимальную экспрессию при температуре культивирования 34–37 °С, pH = 6–7, индукции в середине логарифмической фазы роста, концентрацию ИПТГ менее 1 мМ. Валидацию модели проводили в биореакторах рабочим объемом 3 л. В ходе трех ферментаций продуктивность составила  $6,05 \pm 1,13$  г/л, выход увеличен на 40 %.

### Заключение

Установлено, что при существенном сокращении размера гибридного полипептида за счет использования короткой лидерной последовательности, состоящей из 31 аминокислоты, и изменении сайта протеолиза между С-пептидом и А-цепью можно достичь высоких выходов целевого продукта.

На этапе подбора условий индукции продуктивность штамма-продуцента гибридного белка гларгин была увеличена более чем на 40 %: с  $3,95 \pm 0,5$  г/л до  $6,05 \pm 1,13$  г/л.





4D-график. По оси ординат указана температура индукции, по оси абсцисс — OD600 индукции. Три окна *слева направо* представляют увеличение pH (6, 7, 8), *сверху вниз* — уменьшение концентрации фосфатов (400, 225, 50 mM)

Результаты исследования будут использованы для повышения эффективности производства инсулина гларгин.

## МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

К. А. Брагин, Е. А. Попонина

Кировский государственный медицинский университет

✉ kirill.bragin.2012@mail.ru

### Аннотация

Цель исследования — изучение культуральных и фенотипических свойств мезенхимальных клеток стромы костного мозга доноров. Показано, что выделенные культуры относятся к мезенхимальным стромальным клеткам согласно критериям Международного общества клеточной терапии. Определены следующие параметры клеточных культур: морфологические признаки, степень экспрессии специфичных маркеров, время достижения клетками первичного посева и последующих пассажей конфлюэнтного монослоя, время удвоения количества клеток. Дана характеристика динамики роста.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) — это гетерогенная группа клеток, которые имеют стволовую природу и способны к самоподдержанию и дифференцировке в ткани мезенхимального происхождения. Популяции МСК имеют естественную вариабельность экспрессии маркеров и могут проявлять фенотипическую изменчивость во времени. Кроме того, ни один из маркеров не является специфичным для МСК, поэтому Международным обществом клеточной терапии (*International Society of Cellular Therapy, ISCT*) были утверждены критерии для определения МСК: экспрессия маркеров CD73+, CD90+, CD105+, адгезия к пластику, способность дифференцироваться в ткани мезодермального листка. Также в настоящее время не существует единого протокола выделения и культивирования МСК.

### Материалы и методы

МСК получали при стандартной процедуре миелоэкспузии из костного мозга доноров ( $n = 7$ ). Выделение ядросодержащих клеток проводили путем фракционирования на градиенте плотности (фиккол  $\rho = 1,077$ ). МСК культивировали в полной питательной среде, содержащей среду  $\alpha$ MEM с добавлением тромбоцитарной плазмы (4 %), гепарина (2 Ед/мл), L-глутамина.

МСК культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С и содержании углекислого газа 5 %. Полную замену питательной среды проводили на 4–5-е сутки. После формирования культуру монослоя обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина и засеивали по флаконам из расчета  $1,5\text{--}2 \times 10^5/\text{см}^3$ .

МСК идентифицировали согласно критериям ISCT. Фенотипическую характеристику МСК определили методом проточной цитометрии (FACS Canto II). Оценивали время достижения клетками монослоя и время удвоения. При сравнении результатов применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Значения менее 0,05 рассматривали как достоверные.

### Результаты

Выделенные колонии при морфологической оценке были представлены однотипными клетками веретеновидной формы, прикрепленными к пластиковой поверхности культурального флакона. При дальнейшем культивировании клетки образовывали монослой на 18-е сутки. Иммунофенотип выделенных клеток соответствует критериям ISCT (табл. 1).

Таблица 1

Экспрессия маркеров в культурах МСК (% клеток)

Маркер	Пассаж		
	0	1	2
CD73	92,0 (88,2; 96,1)	96,7 (90,0; 96,95)	94,0 (91,4; 97,1)
CD90	92,5 (89,0; 94,4)	97,4 (90,1; 97,8)	95,4 (93,0; 96,6)
CD105	87,3 (83,4; 91,9)	82,9 (82,1; 89,2)	93,4 (91,5; 94,9)
CD34	0,0 (0,0; 0,3)	0,5 (0,0; 0,8)	0,2 (0,0; 0,7)
CD45	0,0 (0,0; 0,7)	0,0 (0,0; 0,2)	0,1 (0,0; 0,4)
HLA-DR	1,0 (0,5; 1,9)	0,8 (0,6; 1,6)	1,8 (1,4; 2,7)

Примечание. Медиана (Квартиль 1; Квартиль 3).

Иммунофенотипическая характеристика не изменялась на протяжении трех пассажей, что свидетельствовало об однородности полученных культур. Таким образом, выделенные клетки можно расценивать как МСК.

Медиана времени, за которое клетки первичного посева образовывали монослой, для изученных культур составила 18 суток (табл. 2). Длительность каждого последующего пассажа образцов МСК определялась временем, необходимым для достижения конфлюэнтного клеточного слоя в культуральном флаконе.

Продолжительность пассажа в определенной мере зависит от плотности посева. В связи с этим для более полной характеристики пролиферативного потенциала МСК определено время удвоения количества клеток (см. табл. 2), не зависящее от числа взятых на посев элементов.

Таблица 2

#### Показатели скорости роста культуры мезенхимальных клеток костного мозга доноров

Показатель	№ пассажа		
	0	1	2
Время достижения монослоя, сут.	18 (16; 20)	9 (8; 10)	14 (9; 14)
Время удвоения культуры, ч		59 (54; 71)	106 (69; 112)

*Примечание.* Медиана (Квартиль 1; Квартиль 3)

Статистически значительных отличий по параметрам роста культур между пассажами не получено (критерий Вилкоксона,  $p > 0,05$ ), что свидетельствует о достаточной пролиферативной активности клеток на 2-м пассаже.

#### Заключение

Полученные культуры отвечали критериям ISCT, позволяющим идентифицировать их как мезенхимальные. С помощью данной методики можно получать клетки со стабильным фенотипом, и она пригодна для дальнейшего применения. Пролиферативная активность клеток на 1-м и 2-м пассаже сопоставима.

## ИНКАПСУЛЯЦИЯ МИКРОЧЕРЕНКОВ ХМЕЛЯ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ *IN VITRO* ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА\*

Е. С. Бровко, Л. П. Хлебова

*Алтайский государственный университет, Барнаул*

✉ alenaplyuscheva.721@mail.ru

### Аннотация

Разработан протокол *in vitro* инкапсуляции микрочеренков сортового хмеля для среднесрочного сохранения оздоровленного от вирусов генофонда, перспективного для производства посадочного материала.

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) — двудомное многолетнее растение, получившее широкую распространённость благодаря использованию его женских соцветий в пивоваренной промышленности. Он является незаменимым сырьём для пивоварения, придающим напитку специфический аромат и уникальный вкус хмелевой горечи, что обусловлено  $\alpha$ - и  $\beta$ -горькими кислотами и эфирными маслами, выделяемыми лупулиновыми железами шишек. Хмель, как многолетняя монокультура, возделывается на одном и том же участке до 15–20 лет. Вегетативное размножение и длительное использование монокультуры приводит к ее поражению различными видами фитофагов, фитопатогенов, виридов и вирусов. Последние являются основным препятствием для получения высоких урожаев надлежащего качества. Один из подходов минимизации последствий вирусных инфекций — постоянный мониторинг их распространения, а также диагностика и оздоровление маточных растений с последующим микроразмножением *in vitro*, позволяющим в относительно короткие сроки получить необходимый объём посадочного материала.

Широко распространённый способ сохранения ценных генетических ресурсов — их поддержание в виде активных коллекций в культуре ткани, что требует регулярных пересадок. При этом возникает проблема сохранения сортовой типичности объектов, поскольку субкультивирование не исключает индукции различных модификаций. Для увеличения интервала между пассажами используют различные приемы, позволяющие замедлить рост микрорастений, наиболее распространёнными среди которых являются пониженные температуры, добавление осмотиков и ретардантов. Однако это даёт возможность хранить ограниченное количество эксплантов. Кроме того, при использовании таких методов не исключён длительный период реабилитации и дальнейшей адаптации микрочеренков. Технология депонирования различных пропагул в виде биокапсул позволяет значительно сократить затраты на поддержание *in vitro* коллекций и сохранить исходные характеристики материала при выращивании микрорастений. Цель настоящего исследования — разработка протокола инкапсуляции эксплантов сортового хмеля, прошедшего процедуру оздоровления от вирусных инфекций и последующего микроразмножения в культуре ткани *in vitro*.

Диагностику наличия вирусной инфекции в образцах листьев сорта *Флагман* проводили методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием наборов ООО «Синтол». *Potato Virus M* выявлен в 45 %, *Prunus Necrotic Ring Spot Harvirus* — в 20, *Tobacco Mosaic Virus* — в 12 % проб. Инфицированные растения подвергали термотерапии в сочетании с культурой апикальных меристем. Микроразмножение оздоровленных культур проводили на среде Мурасиге — Скуга (МС), включающей 1 мг/л ГКЗ и 0,5 мг/л ТДЗ. После ретестирования микрорастений на исследуемые вирусы их клонировали и использовали для инкапсуляции.

Для инкапсуляции эксплантами служили микрочеренки размером 2–3 мм с двумя пазушными почками, выделённые из культивируемых *in vitro* оздоровленных побегов. На первом этапе пропагулы погружали на 10 мин в инкапсулирующий раствор, приготовленный на основе среды МС, обогащённой 2 мг/л БАП, 1 мг/л GA3, 20 г/л глюкозы (рН 5,8–5,9). Гелеобразующим агентом служил 4 % альгинат натрия. На стадии комплексообразования микрочеренки, покрытые альгинатом, погружали на 5 мин в 10%-й раствор хлорида кальция. Затем микрокапсулы трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в чашки Петри на двойной слой увлажнённой фильтровальной бумаги. Растворы для инкапсуляции подвергали автоклавированию при 121 °С в течение 20 мин. Все процедуры проводили асептически в ламинарном боксе. Чашки Петри с капсулами хранили в холодильнике при 4 °С. Каждые 2 месяца по 15 инкапсулированных микропобегов помещали *in vitro* в пробирки на питательную среду МС того же состава, что и инкапсулирующий раствор. Учитывали жизнеспособность эксплантов, количество растущих побегов/эксплант и среднюю длину побега. Инкапсулированные экспланты в течение 10 месяцев консервации сохраняли 100 % жизнеспособность и высокий потенциал роста в культуре ткани. Таким образом, разработанный протокол может быть использован для кратко- и среднесрочного депонирования ценных генотипов сортового хмеля.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-26-20092).

## DEVELOPMENT OF A PLATFORM AND SOFTWARE FOR OBSERVING THE PROPERTIES OF BIO-SUBSTRATES ON A MODEL SYSTEM OF NEMATODES *C. ELEGANS*

M. V. Budaeva<sup>1</sup>, A. M. Podvalny<sup>1</sup>, D. V. Goverdovsky<sup>1</sup>, E. I. Marusich<sup>1</sup>, V. S. Chernyshev<sup>2</sup>, S. V. Leonov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Moscow Physical and Technical Institute, Dolgoprudny

<sup>2</sup>Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow

<sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino

✉ budaeva.mv@mipt.ru

### Abstract

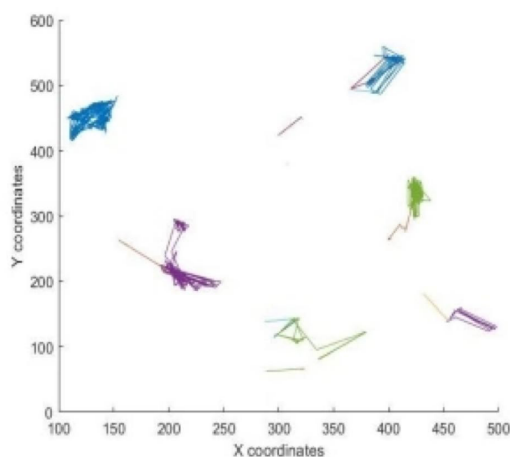
A platform for a real-time camera shot of the nematodes *Caenorhabditis elegans* patterns of movements has been developed. The platform software for analysis of nematodes patterns of movements has been designed. The platform enables a wide range of applications, including the evaluation of the geroprotective effect of new drugs on *C. elegans* model system.

Nematodes *C. elegans* present a popular system of model organisms. The traction of their behavioral locomotor characteristics of the movement often serves as an indicator of their viability in the study of the neurological control of the sensor and motor systems in modelling age-related, in particular neurodegenerative diseases. The automatization of the process of detection, calculation of nematodes and the analysis of their movement patterns accelerates the experiment time and reduces the cost of manual labour of researchers. Nowadays, there are devices for studying the nematodes and computer programs [2] to record their photo and video images with functions of recognition [1] in frame, etc. The main drawback of these platforms is the lack of parallel analysis of several characteristics of the nematodes. Moreover, there are no programs for the definition of the nematode patterns to predict their activity and therefore the activity of the tested drugs with geroprotective, neurodegenerative potentials, etc. Based on the laboratory development of innovative drugs and agrobiotechnology MIPT the device and the software for the automation of data processing of *C. elegans* was developed. The software uses the package MATLAB and the methods of computer vision. The recording of the experimental data was conducted using a high-resolution camera built into the device. The program detects the movement of the nematodes in the laboratory plates on the video file recorded during the experiment. The program module with the ability to count nematodes from the video file has been designed, in comparison to the processing only the photo images in the previous version of the program. In addition to it, a video files library of experimental data has been collected for the programme training. Specialized models of tablets from PDMS material, printed on the 3D printer have been developed. The programme module for the segmentation of intersecting nematodes and the identification of their segments with the application of machine learning methods is being developed.

The software will facilitate the collection of the experimental data such as nematode counting, tracking their morphological characteristics, etc. Moreover, tracking the movements patterns of an individual in a large nematode population will allow to enter into the research practice predictive approach to earlier diagnostics of the geroprotective activity for a large number of new drugs.

### References

1. Roussel N., Sprenger J., Tappan S. J., Glaser J. R. Robust tracking and quantification of *C. elegans* body shape and locomotion through coiling entanglement, and omega bends // *Worm*. 2014. Vol. 3 (4). P. e982437.
2. Sauvage P., Argentina M., Drappier J. et al. An elasto-hydrodynamical model of friction for the locomotion of *Caenorhabditis elegans* // *J. Biomech*. Vol. 44 (6). P. 1117–1122.



The graph of the position of nematode bodies in time reflects the pattern of the nematode movement that enables their distinction through locomotor activity

## РАЗРАБОТКА И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* — ПРОДУЦЕНТА ГИБРИДНОГО БЕЛКА ПРОИНСУЛИНА

Е. А. Буслаева, З. Р. Хасаншина, И. А. Корнаков, С. Э. Робустова, В. И. Шмурак, В. Ф. Латыпов

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

✉ Evgeniia.Buslaeva@geropharm.com

### Аннотация

Разработана генетическая конструкция, обеспечивающая стабильную экспрессию проинсулина. Создан дрожжевой штамм-продуцент, способный расти на дешевых питательных средах без добавления антибиотика в качестве селективного маркера. Экспрессия рекомбинантного проинсулина находится под контролем ТР1-промотора. Содержание рекомбинантного проинсулина человека в культуральной жидкости на 62-м ч культивирования в биореакторе составляло  $31 \pm 5$  мг/л.

Сахарный диабет признан Всемирной организацией здравоохранения глобальной пандемией. Ежегодно с 2016 г. отмечается прирост более 315 тыс. новых пациентов. Инсулинотерапия используется при лечении пациентов с сахарным диабетом, следовательно, получение доступных и качественных инсулинов является стратегически важным направлением развития фармацевтической отрасли.

В промышленных масштабах инсулин и его аналоги производятся с помощью дрожжевых и бактериальных систем экспрессии. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* обладают всеми преимуществами бактериальной системы экспрессии: имеют эффективную систему секреции белков в культуральную жидкость, способны выполнять посттрансляционные модификации, невосприимчивы к вирусам и фагам.

**Цель данной работы** — разработать штамм-продуцент *S. cerevisiae* рекомбинантного проинсулина человека и оценить продуктивность полученного штамма в процессе ферментации.

### Получение штамма-продуцента

Разработан дизайн гибридного белка, обеспечивающий высокий уровень секреции рекомбинантного белка в культуральную жидкость.

Для обеспечения стабильной репликации плазмиды создан штамм *S. cerevisiae*, в котором делегирован ген тризофосфатизомеразы (ТР1). Показано, что разработанный штамм не способен расти на средах с глюкозой. Полный ген ТР1 вставили в плазмиду. В качестве основных элементов генетической конструкции выбраны промотор и терминатор ТР1. Конструкцию вводили в штамм-хозяин с использованием электропорации. Провели трехэтапный отбор клонов. Подлинность конструкции и штаммов подтверждена секвенированием.

С помощью вестерн-блоттинга показано, что весь гибридный белок секретируется в культуральную жидкость.

### Культивирование штамма-продуцента

Для предварительной оценки продуктивности полученного штамма провели культивирование в биореакторе объемом 5 л. Для снижения эффекта Крэбтри выбрана стратегия периодического культивирования с подпиткой, при которой основные питательные вещества подаются в биореактор постепенно во время культивирования.

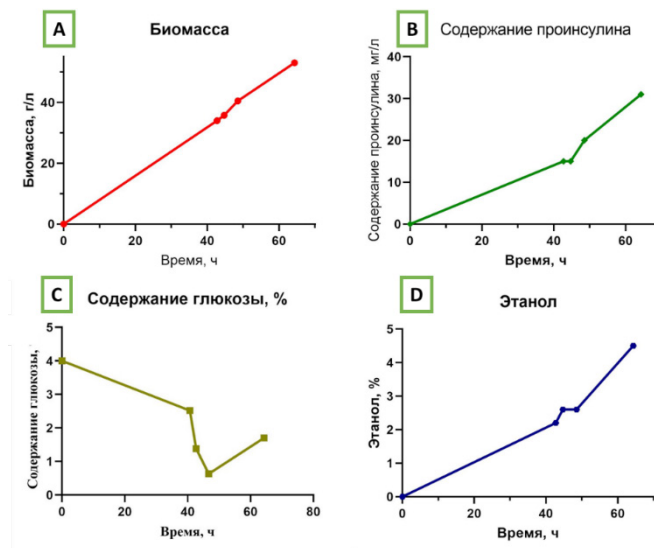
На рисунке показаны обобщенные результаты ферментации, включающие значения биомассы, содержание глюкозы, этанола, проинсулина.

Как показано на рисунке, *A* и *B*, в течение всего процесса культивирования наблюдается рост биомассы и накопление проинсулина. На 64-й ч культивирования продуктивность составила  $31 \pm 5$  мг/л.

Выявлено, что на 64-й ч содержание этилового спирта достигло 4,5 % (см. рисунок, *D*). Накопление спирта связано с переключением с дыхания на брожение. Синтез этанола более 1 % может влиять как на рост культуры, так и на биосинтез рекомбинантного белка. По кинетике роста видно, что к 64-му ч культура не переходит стационарную фазу роста. Однако увеличение содержания глюкозы в среде до 1,71 % (см. рисунок, *C*) показывает, что скорость поступления глюкозы в биореактор превышает скорость утилизации. Следовательно, культура начала замедляться.

### Доказательство подлинности белка

Подлинность белка подтверждена методом ВЭЖХ-МС. Показано наличие гибридного белка в исходном образце и инсулина в образце после трипсинолиза. На следующем этапе планируется провести эксперименты по подбору условий культивирования, в том числе состава питательной среды и подпитки.



Результаты ферментации: *A* — значение биомассы, г/л;  
*B* — содержание проинсулина, мг/л; *C* — содержание глюкозы, %;  
*D* — содержание этанола, %

### Заключение

Разработан дрожжевой штамм-продуцент, экспрессирующий проинсулин. Показано, что целевой белок секретируется в культуральную жидкость. Оценена продуктивность штамма-продуцента в процессе периодического культивирования с подпиткой. Продуктивность составила  $31 \pm 5$  мг/л. Выявлено, что культура на конец ферментации не вышла в стационарную фазу роста, следовательно, возможно увеличение выхода проинсулина. Подлинность полученного продукта подтверждена ВЭЖХ-МС.

**СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА КАРТОФЕЛЯ МЕТОДАМИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ\***

О. В. Бычкова

*Алтайский государственный университет, Барнаул*

✉ olga4ka\_asu@mail.ru

**Аннотация**

В работе представлено влияние маннита на эффективность среднесрочного сохранения картофеля в культуре *in vitro*. Установлено, что использование маннита (2,5–7,0 г/л) позволяет увеличить межфазный период в 1,5–3 раза. Отмечено, что добавление маннита к исходной среде для культивирования тканей не снижает ростовые процессы растений после переноса на стандартную среду (без маннита). Кинетика развития мериклонов не отличается по срокам от контроля.

Создание *in vitro* коллекций генетических ресурсов, в том числе сельскохозяйственных растений, предполагает поиск способов замедления роста регенерантов, поскольку увеличение количества субкультивирования приводит к ухудшению качества размножаемого материала. Методы, позволяющие ограничить рост, как правило, основаны на изменении регламентов культивирования. Это позволяет при необходимости легко переключаться на режим быстрого тиражирования.

Цель данной работы — изучение влияния маннита на эффективность среднесрочного сохранения картофеля в культуре *in vitro*.

Объектом служили сорта картофеля Сувенир Горного Алтая и Монастырский (селекция ГАГУ). Тестировали варианты питательных сред Мурасиге — Скуга (0,7 % агара, 2,0 % сахарозы) с добавлением маннита в концентрации 2,5–10 г/л (шаг 2,5 г). Контроль — питательная среда без содержания осмотика. Инкубация происходила при стандартных условиях ( $23 \pm 2$  °С, освещенность 2 клк, фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь) без субкультивирования. В процессе культивирования отмечали фазы роста, а также фиксировали сроки образования морфологических структур на стадии интенсивного роста: формирование 2 настоящих листьев, 2–3 междоузлий (1 фаза), 4–6 междоузлий (2 фаза) и более 7 междоузлий (3 фаза).

В зависимости от группы спелости мериклоны картофеля показывали различную скорость развития. Регенеранты сорта Сувенир Горного Алтая формировали 2–3, 4–6 и более 7 междоузлий на 7, 18 и 27-е сутки соответственно. Сорт Монастырский достигал соответствующих фаз развития на 3–7-е сутки позже.

Низкая концентрация маннита (2,5 г/л) не снижала скорость роста в начале развития. Однако более длительное нахождение на питательных средах со стресс-фактором привело к увеличению периода культивирования до стадии замедленного роста на 9–16-е сутки. Высокое содержание маннита (5,0–10,0 г/л) позволяет увеличить межфазный период в 2–3 раза относительно контроля.

На стадии формирования 2–3 междоузлий (фаза 1) содержание осмотика 10 г/л достоверно снижало не только скорость развития, но и высоту регенерантов. Средняя высота мериклонов составляла 14 мм (Сувенир Горного Алтая) и 15 мм (Монастырский) против контроля 20,7 и 21,6 мм соответственно. Содержание маннита в питательной среде в концентрации 2,5–7,5 г/л способствовало сокращению длины побега на 40–60 % в зависимости от сорта.

Скорость формирования 4–6 междоузлий (переход во вторую фазу развития) снижалась относительно контроля с увеличением действия осмотического агента. Данный показатель варьировал от 5,4 до 8,3 в зависимости от сорта и содержания маннита, тем самым снижая коэффициент размножения в 1,5–2 раза.

Более длительное культивирование в условиях осмотического стресса позволило регенерантам сформировать 7 междоузлий и более (фаза 3) и достичь высоты, достоверно не отличающейся от контроля. Однако продолжительность межфазного периода превосходила контрольное значение и составила 44–98 суток в зависимости от генотипа и концентрации маннита.

Таким образом, использование маннита позволило поддерживать устойчивое жизнеспособное состояние сохраняемых побегов и растений картофеля изучаемых сортов при низкой интенсивности ростовых процессов. При этом полученные регенеранты можно отнести к стандартным растениям, т. е. образующим не менее 4 междоузлий, темно-зеленого цвета с хорошо развитой листовой пластинкой и корневой системой.

\* Исследование выполнено в рамках реализации Программы поддержки научно-педагогических работников ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», проект «Использование биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур».



## ВАКЦИНА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ «БЕТУВАКС-КоВ-2» ПРОТИВ COVID-19

А. В. Вахрушева<sup>1,2</sup>, А. В. Кудрявцев<sup>1,2</sup>, Н. А. Крючков<sup>3</sup>, М. Е. Фролова<sup>4</sup>,  
К. А. Благодатских<sup>5</sup>, А. А. Исаев<sup>4</sup>, И. В. Красильников<sup>6</sup>

<sup>1</sup>ООО «Бетувакс», Москва

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

<sup>3</sup>ООО «Клиникал Экселанс Груп», Москва

<sup>4</sup>ПАО «ИСКЧ», Москва

<sup>5</sup>ООО «Центр Генетики и Репродуктивной Медицины “ГЕНЕТИКО”», Москва

<sup>6</sup>ООО «Развитие Биотехнологий», Москва

✉ vakhrusheva@betuvax.ru

### Аннотация

Субъединичная вакцина «Бетувакс-КоВ-2», направленная против SARS-CoV-2, основана на технологии вирусоподобных сферических наночастиц «Бетусфера» с инкорпорированными в них рекомбинантными субъединицами белка *Spike*. Вакцина «Бетувакс-КоВ-2» прошла все этапы доклинических и фазы I–II клинических испытаний, где показала высокий профиль безопасности и эффективности с образованием высокого титра нейтрализующих антител.

В ходе доклинических испытаний протективность вакцины «Бетувакс-КоВ-2» была оценена на золотистых (сирийских) хомяках ( $n = 54$ ) и макаках-резусах ( $n = 18$ ). Хомякам вводили вакцину внутримышечно в количестве 5 и 20 мкг, после чего на 42-е сутки после начала вакцинации хомяков интраназально заражали SARS-CoV-2 в концентрации  $10^5$  БОЕ (бляшкообразующие единицы). В группе хомяков, получавших 20 мкг/животное, на 6-е сутки индекс вирусной супрессии был выше  $1,8 \lg$ , что свидетельствует о полном отсутствии продукции вируса в легких по сравнению с плацебо ( $p < 0,01$ ).

Гистологическая оценка тканей макак-резусов также подтвердила, что животные, вакцинированные внутримышечно дозой 5 или 20 мкг, не демонстрировали выраженных признаков поражения сосудистого компонента легких, в отличие от контрольной группы, но в большей степени имели воспалительный ответ иммунной системы, что, вероятно, связано с вакцинацией. Кроме того, иммунохимическая идентификация S-белка установила более низкий его уровень у вакцинированных макак в сравнении с невакцинированными. При изучении защитной активности как у макак-резусов, так и у хомяков не было зафиксировано проявлений эффекта антитело-зависимого усиления от вакцины [1, 2].

На первом этапе клинических испытаний включено в исследование 20 добровольцев, по 10 человек в группах 1 (Г1) и 2 (Г2). Вакцину «Бетувакс-КоВ-2» добровольцам вводили двукратно по схеме: Г1 — 20 мкг + 5 мкг, Г2 — 20 мкг + 20 мкг. На втором этапе клинических испытаний было включено в исследование 96 добровольцев, по 32 человека в группах 3 (Г3), 4 (Г4) и 5 (Г5). Вакцину «Бетувакс-КоВ-2» добровольцы получали двукратно по схеме: Г3 — 20 мкг + 5 мкг, Г4 — 20 мкг + 20 мкг, Г5 — плацебо.

Результаты промежуточного анализа после прохождения всеми участниками первого и второго этапа исследования Визита 18 показали благоприятный профиль безопасности и хорошую переносимость препарата «Бетувакс-КоВ-2». Основанием для данного вывода послужили: отсутствие клинически значимых межгрупповых различий при оценке по критериям безопасности и переносимости; характеристики и распределение по исследуемым группам зарегистрированных нежелательных явлений; отсутствие клинически значимых межгрупповых различий жизненно важных показателей, параметров инструментальных (ЭКГ) и лабораторных исследований (ОАК, БхАК, и ОАМ). Серьезных нежелательных явлений, имеющих связь с вакцинацией, выявлено не было.

Установлено, что введение препарата «Бетувакс-КоВ-2» по схемам «20 + 5 мкг» (Г3) и «20 + 20 мкг» (Г4) в сравнении с введением плацебо (Г5) приводит к достоверному повышению медианной концентрации IgG-антител к RBD-антигену коронавируса SARS-CoV-2 в ИХЛА (BAU/мл) через 21 день после введения второй дозы исследуемого препарата (медианы в Г3 vs Г5: 556,88 vs 2,96 BAU/мл,  $p = 0,001$ , Dunn test; медианы в Г4 vs Г5: 736,71 vs 2,96 BAU/мл,  $p < 0,001$ , Dunn test).

Таким образом, результаты промежуточного анализа фазы I–II клинических испытаний показали благоприятный профиль безопасности, хорошую переносимость и высокую иммуногенность вакцины «Бетувакс-КоВ-2».

**Литература**

1. Krasilnikov I. V., Kudriavtsev A. V., Vakhrusheva A. V. et al. Design and Immunological Properties of the Novel Subunit Virus-like Vaccine against SARS-CoV-2 // *Vaccines*. 2022. № 10 (1). P. 69.
2. Vakhrusheva A. V., Kudriavtsev A. V., Kryuchkov N. A. et al. SARS-CoV-2 Subunit Virus-like Vaccine Demonstrates High Safety Profile and Protective Efficacy: Preclinical Study // *Vaccines*. 2022. № 10. P. 1290.

## UNIVERSAL GENETIC CONSTRUCTION FOR SECRETING EXPRESSION OF INFLUENZA HEMAGGLUTININ IN INSECT CELLS

V. M. Vakhtinskii, I. L. Tutykhina

*The Gamaleya national research center of epidemiology and microbiology*

✉ vakhvladimir@yandex.ru

### Abstract

A universal genetic construction applicable for expression and easy purification of any secreting trimeric proteins in insect cells was obtained. The efficiency was tested with the gen of model hemagglutinin of influenza B/Colorado/03/2017 and western-blot with anti-HA monoclonal mouse antibodies.

### Introduction

World Health Organisation (WHO) estimates the annually quantity of severe cases of influenza from three to five millions, and the quantity of registered cases of death to be in the range of 290 00 to 650 000. It is estimated, that the real quantities are even higher, than registered [1].

The only effective way to prevent the infection is vaccination. However, due to a high rate of mutations in the genome of influenza viruses permanent modification of vaccines is required. In addition it is crucial to check and measure the efficacy of modified vaccines [1]. There are different test-systems, such as virus-neutralization and agglutination test, but the most convenient is Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which requires the purified virus antigen.

Since one of the most common targets for vaccines is hemagglutinin we focused on a quick and easy way to obtain sufficient quantities of it.

Basically there are two ways to get the protein: to purify it from a natural virus or to express its recombinant version in other organism. The first approach requires several precautions, as it includes working with replication competent virus. The second approach poses a problem of choosing a proper expression system: the profile of glycosylation is crucial for antibodies recognition [2].

We chose the baculovirus expressions system as it provides the closest glycosylation profile, compared to mammalian expression system. Moreover, insect cells do not have surface receptors, binding to hemagglutinin, that prevents cell agglutination and death, increasing protein yields [2].

The aim of our research was to make the universal construction for hemagglutinin expression, then to insert there a gen of model hemagglutinin (B/ Colorado/03/2017) and finally check its ability to interact with anti-influenza antibodies.

### Results

1. We constructed the shuttle plasmid, pFast-Bac-HTB. The cassette includes the gp64— sequence needed for secreting the protein, HA— hemagglutinin, Foldon— peptide, forming a trimeric structure and His-tag for purification on Nickel agarose.

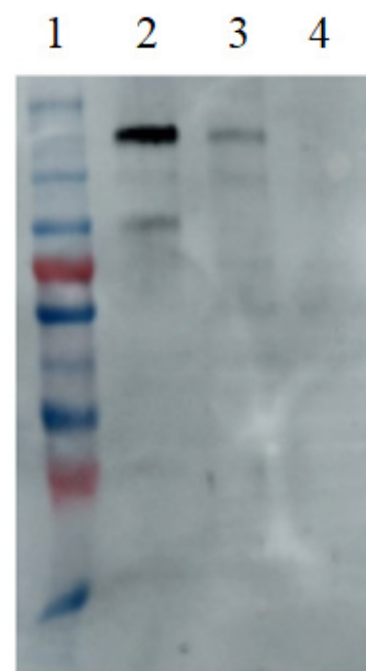
2. With the use of Bac-to-Bac Kit we made a recombinant baculovirus *Autographa Californica* expressing and secreting the model hemagglutinin to the medium [3].

3. We purified the recombinant hemagglutinin using the Nickel-agarose.

4. The purified hemagglutinin and the medium were successfully checked with anti-HA influenza B mouse monoclonal antibodies [4]. The results of western-blot are presented below (figure).

### Conclusion

We have successfully obtained a universal vector construction applicable for protein expression and secreting in insect cells.



Western-blot. With Influenza B HA Antibody, Mouse Mab [4]:  
1 — PageRuler™ Prestained NIR Protein Ladder; 2 — 5 µl of elution buffer, containing recombinant hemagglutinin; 3 — 15 µl of medium before purification; 4 — negative control, 15µl medium of cells, expressing GFP

**References**

1. World Health Organization. Fact Influenza (seasonal). URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (accessed: 14.08.2022).
2. Demain A. L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // *Biotechnol. Adv.* 2009. Vol. 27, № 3. P. 297–306.
3. Thermo fisher Bac-to-Bac manuals. URL: [/https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https %3A %2F %2Fassets.thermofisher.com %2FTFS-Assets %2FLSG %2Fmanuals %2Fbevttest.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fbevttest.pdf) (accessed: 14.08.2022).
4. Sinobiological Catalogue antibodies. URL: <https://www.sinobiological.com/antibodies/hemagglutinin-ha-11053-mm06> (accessed: 14.08.2022).

## ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛА ДЛЯ ЛИНИЙ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е. В. Вдовиченко<sup>1</sup>, Л. И. Козловская<sup>1,2</sup>, С. А. Лебедева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М. П. Чумакова РАН, Москва

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

✉ liz010203@yandex.ru

### Аннотация

Цинк является цитотоксическим опухолевым супрессором, что дает основание рассматривать его как потенциальное терапевтическое средство. Исследована токсичность 10 металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазола для различных линий опухолевых клеток. Наиболее чувствительны к действию соединений были линии Hep2c и RD. Дальнейшее изучение соединений может стать основой для разработки новых противоопухолевых препаратов.

Злокачественные новообразования — одна из наиболее сложных проблем общественного здравоохранения. В настоящий момент химиотерапия применяется для лечения большинства случаев злокачественных новообразований, однако имеет ряд ограничений и не всегда эффективна. Клинические данные показывают, что концентрация цинка заметно снижается у пациентов с онкологическими заболеваниями, а также он поддерживает экспрессию рецепторных детерминант, которые делают опухолевые клетки подверженными к лизису [1]. Таким образом, цинк является цитотоксическим опухолевым супрессором, что дает основание рассматривать его в качестве потенциального терапевтического средства. Соединения ряда жизненно важных микроэлементов (металлокомплексов) могут быть использованы в качестве источников цинка. Например, такими соединениями являются металлокомплексы на основе производных имидазолов, входящие в состав природных и синтетических физиологически активных соединений и принимающие участие в ферментативных процессах и связывании микроэлементов в живых организмах.

Цель работы — определение цитотоксичности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазола для линий опухолевых клеток различного происхождения с оценкой 50 % токсической концентрации ( $CC_{50}$ ).

Было исследовано 10 комплексов с ацетатом и хлоридом цинка производных N-алкенилимидазола: бис(N-аллилимидазол) цинкдиацетат (1), бис(N-аллил-2-метилимидазол) цинкдиацетат (2), бис(N-аллилимидазол) цинкхлорид (3), бис(N-аллил-2-метилимидазол) цинкхлорид (4), (бис-N-пропаргил-2-метилимидазол) цинкдиацетат (5), (бис-N-пропаргилимидазол) цинкхлорид (6), (N-алленил-2-метилимидазол) цинкдиацетат (7), бис(N-винилимидазол) цинкдиацетат (8), бис(N-винилимидазол) цинкхлорид (9), (N-изопропенилимидазол) цинкдиацетат (10).

Цитотоксичность соединений оценивали по их способности подавлять метаболическую активность клеток и/или вызывать их гибель по окраске резазурином [2] через 48 ч инкубации клеток с соединениями.

Ни одно из исследованных соединений не оказало токсического действия на референсную линию клеток Vero ( $CC_{50}$  больше максимальной исследованной концентрации, см. таблицу). Наиболее чувствительными к действию соединений оказались линии эпидермоидной карциномы Hep2c и рабдомиосаркомы RD, значения  $CC_{50}$  составили 60–200 мкМ. При этом для обеих культур сравнительно наиболее токсичным оказалось соединение 2 ( $CC_{50}$  для Hep2c составила  $106 \pm 5$  мкМ, а для RD —  $78 \pm 6$  мкМ).

### Цитотоксические концентрации ( $CC_{50}$ ) исследуемых соединений в выбранных культурах клеток ( $M \pm SD$ , мкМ)

Соединение	Линии клеток					
	Vero	A549	Hep2c	RD	MT-4	Jurkat
1	> 200	> 200	$180 \pm 29$	$127 \pm 34$	> 100	> 200
2	> 200	> 200	$106 \pm 5$	$78 \pm 6$	> 100	> 200
3	> 200	> 200	$131 \pm 33$	$69 \pm 8$	> 100	> 200
4	> 200	> 200	$180 \pm 5$	$70 \pm 17$	> 100	> 200
5	> 200	> 200	$129 \pm 14$	$67 \pm 8$	> 100	200
6	> 200	> 200	$151 \pm 13$	$120 \pm 10$	> 100	> 200

Соединение	Линии клеток					
	Vero	A549	Hep2c	RD	MT-4	Jurkat
7	> 200	200	146 ± 49	95 ± 10	> 100	> 200
8	> 200	> 200	176 ± 33	84 ± 15	> 100	> 200
9	> 200	> 200	197 ± 4	83 ± 29	> 100	150 ± 71
10	> 200	> 200	110 ± 1	80 ± 23	> 100	> 200

Дальнейшее изучение этих соединений может стать основой для разработки новых лекарственных препаратов для эффективного лечения некоторых видов рака на основе создания комплексов производных имидазола с цинком.

### Литература

1. Costello L. C., Franklin R. B. Cytotoxic/tumor suppressor role of zinc for the treatment of cancer: an enigma and an opportunity // *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 2012. Vol. 12 (1). P. 121–128.
2. Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin // *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1601. P. 1–17.

## РАЗРАБОТКА ГРИБКОВОЙ ДИЕТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ZOPHOBAS ATRATUS* ДЛЯ НУЖД БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОМЕДИЦИНЫ

В. С. Веремченко<sup>1,2</sup>, М. Т. Ханды<sup>1,2</sup>, А. В. Куприн<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

<sup>2</sup>ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток

✉ veremenko.vs09@gmail.com

### Аннотация

Разработана искусственная «грибковая» диета для культивирования *Zophobas atratus* с целью получения модельного объекта для проведения прикладных и фундаментальных исследований. Показано, что разработанный способ культивирования приводит к сокращению сроков развития у жуков и увеличивает экспрессию антимикробных пептидов в гемолимфе личинок.

В настоящее время поиск оптимальных условий для массового разведения (производства) насекомых имеет важный прикладной и фундаментальный аспект и направлен на решение задач, связанных с получением как новых источников протеинов для кормов и пищевых добавок сельскохозяйственных животных, так и новых антибактериальных соединений для разработки лекарственных препаратов широкого спектра действия, а также для исследования адаптаций насекомых под влиянием факторов среды.

В настоящем исследовании разработана и оценена искусственная «грибковая» диета (ГД) для культивирования жука-чернотелки *Zophobas atratus* в лабораторных условиях с целью получения модельного объекта для изучения особенностей биологии жуков-сапроксилофагов.

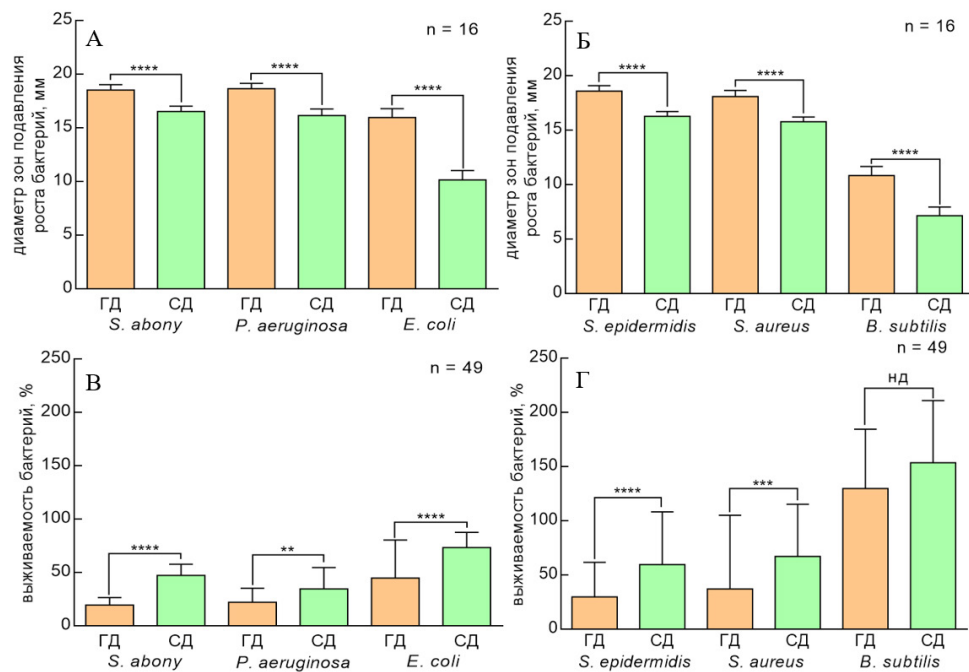
Показано влияние разработанной ГД на организменные функции *Z. atratus*. Для наглядной демонстрации результатов влияние ГД сравнивали относительно влияния стандартной диеты (СД). По биометрическим показателям и особенностям развития жуков, культивируемых на разработанной диете (см. таблицу), установлено, что ГД приводит к сокращению сроков развития (на 2 месяца короче, чем на СД). Из скрининга антибактериальной активности выделенных образцов плазмы в отношении различных штаммов бактериальных культур (см. рисунок) установлено, что образцы из личинок, выращенных на ГД, обладают выраженной антибактериальной активностью по сравнению с образцами из личинок, выращенных на СД. Все образцы значительно лучше ингибируют рост грамотрицательных бактерий, чем грамположительных, что можно объяснить особенностью строения клеточной стенки бактерий.

Данная работа имеет фундаментальное значение для понимания связей между питанием и развитием ксилобионтных жесткокрылых и является первым сообщением о регуляции иммунного статуса данной группы насекомых. А также у этой работы есть и прикладной аспект, так как дальнейшие исследования и поиск оптимальных условий для массового разведения (производства) насекомых позволит получить в короткие сроки линии личинок с развитой иммунной системой и высоким уровнем экспрессии антимикробных пептидов для различных нужд биотехнологии (извлечение и исследование антибактериальных соединений широкого спектра действия, разработка экологически безопасных препаратов для контроля численности вредителей деловой древесины и т. п.).

### Биометрические показатели и продолжительность развития жука *Z. atratus*, культивируемого на ГД

Стадия развития	Длина, мм	Масса, г	Продолжительность развития, дни (Ср. знач. (±) SE)
Яйцо	1,2–1,5	0,1–0,9	6,4(±)0,52
Личинки (L1–L4)	2,2–2,7	1,5–3,5	L1 — 10,8(±)0,92; L2 — 14,8(±)0,79; L3 — 12,2(±)1,14; L4 — 13,6(±)1,51
Личинки (L5–L12)	48,0–52,0	10,0–23,0	L5 — 15,9(±)0,57; L6 — 15,1(±)0,57; L7 — 12,6(±)1,07; L8 — 14,5(±)0,71; L9 — 12,6(±)0,97; L10 — 11,4(±)0,52; L11 — 18,5(±)0,97; L12 — 23,8(±)1,14
Куколка	29,0–45,0	5,6–14,0	9,7(±)0,48
Имаго	30,0–34,4	–	до 7 месяцев

Примечание. Ln — личинки возраста n



Антибактериальная активность плазмы личинок *Z. atratus*, выращенных на разных диетах: А, Б — диаметр зон подавления роста грамотрицательных и грамположительных бактерий; В, Г — процент выживаемости грамотрицательных и грамположительных бактерий. ГД — грибковая диета; СД — стандартная диета



## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОРЕГУЛЯТОРНЫХ МИШЕНЕЙ В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ\*

О. Е. Викторина<sup>1</sup>, Е. А. Колосова<sup>1,2</sup>, А. И. Шаповал<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ olesia\_viktorina@mail.ru

### Аннотация

Оптимизированы и синтезированы гены, кодирующие рекомбинантные молекулы, состоящие из лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1), лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 2 (PD-L2), костимулирующего рецептора CD28 и его лигандов B7-1/B7-2, слитых с константной областью антитела человека, а также рекомбинантный вектор экспрессии рMV, который позволил получить гибридные белки в клетках яичника китайского хомячка (CHO-K1).

Задача по обеспечению отечественными жизненно необходимыми и важнейшими лекарственными препаратами для лечения онкологических заболеваний до сих пор не была реализована в России. Иммуноterapia — один из наиболее эффективных подходов для лечения онкологических заболеваний. Дендритные клетки являются наиболее эффективными антигенпрезентирующими клетками (АПК), способными к индукции недифференцированных Т-хелперов. Одно из семейств молекул на АПК, участвующих в костимуляции, — B7. Представители этого семейства используются как в стимуляции, так и в ингибировании. В связи с этим разработка продуцентов корегуляторных молекул может иметь потенциальное значение для импортозамещающего производства, а также терапевтическое значение для манипулирования иммунным ответом.

В данной работе объединены фрагменты генов корегуляторных молекул, кодирующие внеклеточные домены PD-L1, PD-L2, CD-28, B7-1 и B7-2, с геном, кодирующим константную область человека IgG1. Все конструкции ДНК спроектированы с использованием программного обеспечения SnapGene (*Insightful Science*; snapgene.com). Синтезированные гены клонировали в экспрессирующую плазмиду рMV и трансформировали *E. coli* штамм Stbl3.

Структуру выделенной плазмидной ДНК из амплифицированных положительных клонов подтверждали секвенированием в ЦКП «Геномика». Отобраны клоны с отсутствием дефектов встраиваемых генов. Трансфекцию проводили в клетках CHO-K1. Полученные белки охарактеризовали методами иммунохимического анализа. Молекулярная масса составила 70 kDa, выход белка — примерно 50 мкг/мл. Взаимодействие белков с *anti-human* антителами в вестерн-блоте подтвердило присутствие целевого белка в образцах.

Результаты данного исследования могут быть использованы для производства импортозамещающих молекул, необходимых для изучения иммунного ответа и разработки иммунотерапевтических средств против раковых заболеваний.

\* Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 19-44-220008) и государственного задания Минобрнауки России (№ FZMW-2020-0007).

© О. Е. Викторина, Е. А. Колосова, А. И. Шаповал, Д. Н. Щербаков, 2022

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ-ХОЗЯИНА У ВИЧ-1 ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ЛИЦ

М. А. Винокуров<sup>1</sup>, Д. В. Салеева<sup>1,2</sup>, С. А. Саламайкина<sup>1,5</sup>, А. С. Есьман<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва

<sup>2</sup>ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА, Москва

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ vinokurov@cmd.su

### Аннотация

Кумулятивное количество зарегистрированных ВИЧ-положительных лиц на территории РФ с 1987 г. по состоянию на 31.12.2021 г. составляет 1 562 570 чел. [1]. Применение современных схем антиретровирусной терапии эффективно блокирует репликацию ВИЧ-1, однако полной элиминации достигнуть не удастся и вирус продолжает сохраняться в резервуарах [2].

Эпигенетические факторы могут регулировать латентность и реактивацию ВИЧ-1, влияя на состояние хроматина вблизи вирусного промотора, расположенного на 5'-конце длинных концевых повторов (LTR) [3]. Показано влияние метилирования групп генов хозяина на жизненный цикл ВИЧ-1 [4]. В данной работе рассмотрено метилирование промоторных участков *CCR5*, *CXCR4*, *EZH2*, *MBD2*, *TP53*.

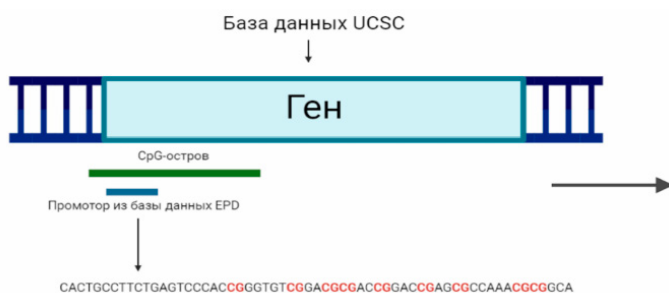


Рис. 1. Алгоритм выбора последовательности для оценки статуса метилирования промоторных участков исследуемых генов

Последовательности для оценки статуса метилирования определяли на промоторных областях исследуемых генов с помощью геномного браузера UCSC [5] путем наложения последовательностей промоторов из базы данных EPD и CpG-островков [6] (рис. 1).

Анализ участков осуществлялся методом секвенирования коротких фрагментов — пиросеквенированием. Для каждой последовательности подобраны специфичные праймеры. Апробация методик проводилась на обезличенных биологических образцах, полученных от ВИЧ-положительных лиц, с вирусной нагрузкой менее 50 коп/мкл. Нуклеиновые кислоты из образцов выделяли

с применением набора «РИБО-преп» (АмплиСенс® ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Бисульфитную обработку нуклеиновых кислот выполняли с использованием набора реагентов «EpiTect Bisulfite Kit (48)» (Qiagen, Германия). ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Пиросеквенирование продуктов ПЦР осуществляли с помощью системы генетического анализа «PyroMark Q24» (Qiagen, Германия).

Разработанные методики для определения статуса метилирования в промоторах исследуемых генов показали высокую специфичность. Анализируемые образцы обладали низким статусом метилирования исследуемых участков. Пример пирограммы представлен на рис. 2.

Разработанные методики в формате пиросеквенирования высокоспецифично детектируют уровень метилирования в CpG-локусах промоторов анализируемых генов (*CXCR4*, *EZH2*, *MBD2*, *TP53*), как представлено в таблице.

### Оценка статуса метилирования на стадии апробации разработанных систем

Ген	Количество CpG-локусов в последовательности	Количество проанализированных локусов	Средний процент метилирования
<i>TP53</i>	3	3	4 ± 2
<i>MBD2</i>	9	9	1 ± 1
<i>EZH2</i>	9	9	7 ± 3
<i>CXCR4</i>	8	8	4 ± 1

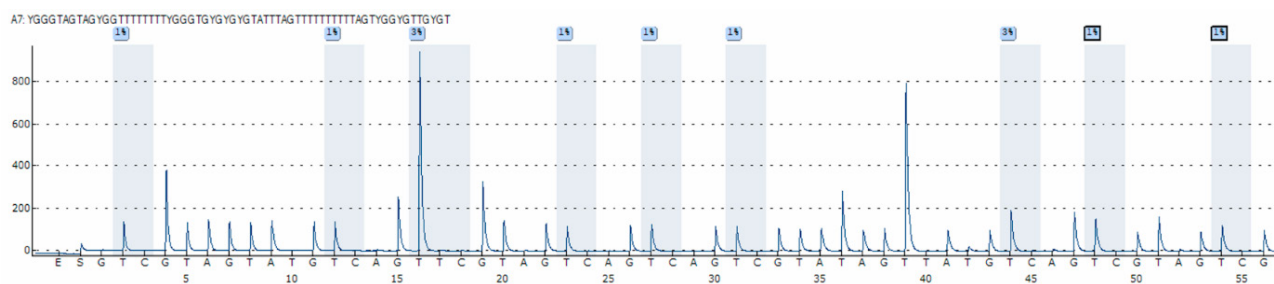


Рис. 2. Пирограмма для участка гена *MBD2*

### Литература

1. ФНМЦ. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. URL: <http://www.hivrussia.info/>.
2. Siliciano J. D., Siliciano R. F. Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1 // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. Vol. 134, № 1. P. 12–19.
3. Trejbalova K., Kovarova D., Blazkova J. et al. Development of 5' LTR DNA methylation of latent HIV-1 provirus in cell line models and in long-term-infected individuals // *Clin. Epigenetics.* 2016. Vol. 8. P. 19.
4. Arumugam T., Ramphal U., Adimulam T. et al. Deciphering DNA Methylation in HIV Infection // *Front Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 795121.
5. Kent W. J., Sugnet C. W., Furey T. S. et al. The human genome browser at UCSC // *Genome Res.* 2002. Vol. 12, № 6. P. 996–1006.
6. Gardiner-Garden M., Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 196, № 2. P. 261–282.

## ФОТОБИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ, РАБОТАЮЩИЙ НА ИСКУССТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОДАХ В КАТОДНОЙ КАМЕРЕ

М. В. Вишневецкая, П. М. Готовцев

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

✉ Vishnevskaya\_MV@rrcki.ru

### Аннотация

В данном исследовании изучена работа безмембранного безмедиаторного фотобиотопливного элемента на основе бактерий *Gluconobacter Oxidans* с микроводорослями *Chlorella Vulgaris* в катодной камере с применением искусственных сточных вод в качестве электролитов. Также проанализирован рост *Chlorella Vulgaris* на искусственных сточных водах.

Поиск альтернативных источников энергии — одна из наиболее значимых задач современности. Биотопливные элементы являются инструментом получения электроэнергии за счет работы живых микроорганизмов или их ферментов [1]. Фотобиотопливные элементы (ФБТЭ) подразумевают совмещение работы с микроводорослями, что позволяет повысить эффективность катодного процесса.

Изучена работа ФБТЭ, состоящего из двух ячеек, соединенных соевым мостиком. Электродами выступала графитированная ткань ТГН-2МК. В катодной камере микроводоросли *Chlorella Vulgaris*, растущие на искусственных сточных водах (ИСВ). В анодной камере ИСВ [2]. На аноде смесь электрогенных бактерий *Gluconobacter Oxidans* и проводящих полимеров PEDOT : PSS : PEGDE в соотношении 4 : 1 : 1 [3].

Проанализирован рост микроводорослей *Chlorella Vulgaris* на ИСВ, которая была изъята из анодной камеры после отработки первого эксперимента. Рост отмечали посредством изменения оптической плотности относительно чистой среды ИСВ. Сравнивалась работа ФБТЭ с дополнительным освещением катодной камеры и без (камера укрывалась фольгой).

Электрохимические измерения проводились на потенциостате-гальваностате Autolab PGSTAT204 (Mertohm) (ПО NOVA 2.0). Применены методы циклической потенциостатической вольтамперометрии и потенциостатической вольтамперометрии с линейной разверткой.

За две недели проведения экспериментов концентрация *Chlorella Vulgaris* достигла своего максимального значения при активном состоянии и вышла на плато. Эффективность работы ФБТЭ оценивалась по значениям максимальной удельной мощности. Она составила для первого дня экспериментов 118 и 109 мВт/м<sup>2</sup> с освещением и без соответственно. В течение всего времени проведения экспериментов повышалась до максимальных значений 189 мВт/м<sup>2</sup> со светом и 160 мВт/м<sup>2</sup> — без.

Рост мощности в течение времени проведения исследования связан с образованием биопленок бактерий на аноде. Также эксперименты подтвердили, что с дополнительным освещением ФБТЭ работает лучше, чем без него. Отсутствие дорогостоящей мембраны и медиатора на аноде делает данный вид ФБТЭ экономически более доступным. А использование ИСВ в качестве электролитов позволяет интегрировать его в очистные сооружения.

Таким образом, данный ФБТЭ может применяться для изучения темы очистки сточных вод с дополнительной выработкой электроэнергии.

### Литература

1. Василев Р. Г., Решетилев А. Н., Шестаков А. И. Биотопливные элементы // Природа. 2013. Т. 12 (1180). С. 65–70.
2. Salgueiro J., Pe' rez L., Maceiras R. et al. Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment // Int. J. Environ. Res. 2018. Vol. 12. P. 765–772.
3. Alferov S., Minaicheva P., Arlyapov V. et al. Bioanode for a microbial fuel cell based on *Gluconobacter oxydans* immobilized into a polymer matrix // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. Vol. 50. P. 637–643.

## АКТИВАЦИЯ ТРАНСПОЗОНОВ КАК НОВЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ\*

А. В. Власова, И. В. Киров, А. А. Соловьев

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

✉ vlasova.nactia@yandex.ru

### Аннотация

Мобильные элементы (МЭ) играют центральную роль в эволюции растений и могут быть мощным эндогенным источником генетической и эпигенетической изменчивости для селекции сельскохозяйственных культур. Среди семейств МЭ растений наиболее изученным является ретротранспозон ONSEN, транспозиция которого активируется при тепловом стрессе и приводит к транскриптомным изменениям и новым фенотипам. В работе исследованы предпочтения инсерций транспозона ONSEN в геноме *Arabidopsis thaliana*, а также идентифицированы генетически наследуемые вставки ONSEN в потомстве растений и изучено их фенотипическое разнообразие.

Изменение климатических условий, приобретение устойчивости патогенов к средствам защиты и быстро меняющиеся технологические запросы агрономов требуют мгновенных решений путем создания нового селекционного материала, который, как правило, сложно получить с помощью традиционной селекции. В связи с этим возникает потребность в подготовке и интеграции новых технологий разработки селекционного материала с заданными свойствами, в том числе и с использованием современных молекулярно-генетических методов. Один из таких методов — активация мобильных элементов с последующим их наследованием.

МЭ благодаря своей возможности перемещаться по геному является основным источником геномной новизны и способствуют адаптации растений, созданию фенотипического разнообразия, видообразованию и производству новых сортов. Однако транспозиционная активность мобильных элементов в растительных клетках находится под строгим эпигенетическим контролем, и большинство МЭ «молчат» в условиях отсутствия стресса [1]. В 2017 г. продемонстрирован метод активации ретротранспозона ONSEN в растениях *Arabidopsis Col-0 wt* путем ингибирования ДНК-метилтрансфераз и РНК-полимеразы II в сочетании с тепловым шоком [2]. Известно, что транспозиция ONSEN приводит к транскриптомным изменениям [3] и новым фенотипам, создавая при этом сырье для селекции растений.

В данном исследовании с помощью ранее описанного принципа тепловой активации ONSEN [2], методов CANS и разработанного нами пайплайна NanoCasTE [4] удалось обнаружить события транспозиции семейства транспозонов ONSEN, которые произошли в ответ на тепловой стресс, и горячие точки его вставок. Изучены как соматические, так и генетически унаследованные вставки ретротранспозона ONSEN. Потомство этих растений содержало до 24 новых вставок ONSEN в своем геноме. Помимо этого, произведено цифровое фенотипирование, позволившее установить четкие фенотипические отличия в мутантах ONSEN в сравнении с диким типом *Arabidopsis Col-0 wt*. Настоящая работа дает возможность быстрой идентификации пораженных генов после активации ТЕ в других растениях, включая агрономически важные культуры.

### Литература

1. Slotkin R. K., Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome // Nat. Rev. Genet. 2007. Vol. 8. P. 272–285.
2. Thieme M., Lanciano S., Balzergue S. et al. Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding // Genome Biol. 2017. Vol. 18. P. 134.
3. Roquis D., Robertson M., Yu L. et al. 2021. Genomic impact of stress-induced transposable element mobility in *Arabidopsis* // Nucleic Acids Res. 2021. Vol. 49. P. 10431–10447.
4. Kirov I. et al. Transposons hidden in *Arabidopsis thaliana* genome assembly gaps and mobilization of non-autonomous LTR retrotransposons unravelled by nanotei pipeline // Plants. 2021. T. 10, № 12. C. 2681.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-74-10055).  
© А. В. Власова, И. В. Киров, А. А. Соловьев, 2022

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА ОСНОВЕ СФЕРОИДОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК \*

М. В. Волкова<sup>1</sup>, М. О. Соколова<sup>2</sup>, В. В. Бояринцев<sup>1</sup>, А. В. Трофименко<sup>1</sup>, Г. И. Фильков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

✉ biotech.volkova@list.ru

### Аннотация

Цель работы — оценка эффективности применения сфероидов мезенхимальных стромальных клеток в терапии травм кожи и мягких тканей. Установлено двукратное увеличение содержания факторов роста в клетках сфероидов по сравнению с единичными клетками. В эксперименте на модели полнослойной раны отмечено значительное снижение ее площади, отсутствие формирования рубцовой ткани, проведена оценка содержания ключевых цитокинов и факторов роста в тканях.

Одними из наиболее распространенных заболеваний являются ранения различного характера. Только в России ежегодно регистрируется более 6 млн случаев поверхностных травм и открытых ран [1]. Заживление повреждений кожи нередко осложняется течением инфекционных и воспалительных процессов.

Способность мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток (ММСК) регулировать воспаление и стимулировать рост сосудов обуславливает перспективность их применения в клеточной терапии ран различной этиологии [2, 3]. Эффективность такого способа лечения в первую очередь обеспечивается способностью ММСК секретировать широкий спектр факторов роста, цитокинов и хемокинов, модулирующих функции клетки [4]. С другой стороны, высокий уровень гибели и плохое приживание клеток в ишемических условиях снижает эффективность терапии стволовыми клетками: через 4 дня после трансплантации выживают менее 1 % ММСК [5].

Существуют различные подходы для повышения эффективности терапии на основе ММСК [6], например получение клеточных сфероидов. Сфероиды ММСК демонстрируют повышенную противовоспалительную и ангиогенную активность, улучшенную выживаемость [7, 8]. В частности, тесное взаимодействие клеток и наличие гипоксического ядра значительно способствует увеличению секреторной активности сфероидов по сравнению с единичными клетками [9]. Цель научно-исследовательской работы — оценка эффективности применения сфероидов ММСК в терапии травм кожи и мягких тканей.

Для подготовки клеточных сфероидов использовались охарактеризованные культуры ММСК мыши, выделенные из красного костного мозга или жировой ткани согласно стандартными методикам [10, 11]. Получение клеточных сфероидов осуществляли путем культивирования в агарозных подложках, изготовленных с помощью микроформ MicroTissues® 3D Petri Dish® (MicroTissues Inc., США). Рассмотрены питательные среды на основе  $\alpha$ MEM, DMEM, DMEM/F12 (3 : 1) без добавления сыворотки и ГибриС-1 (все ПанЭко, Россия). Среда на основе DMEM и DMEM/F12 способствовали формированию плотных достаточно крупных сфероидов в первые сутки культивирования. Для последующих экспериментов в качестве питательной среды использовали DMEM с добавлением заменимых аминокислот (*Scientific Capricorn*, Германия).

Для оценки секреторной активности определяли содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) и фибробластов (bFGF), а также тромбоцитарный фактор роста (PDGF AB+BB) в клеточных лизатах методом интерферометрии слоя биомолекул и иммуноблоттинга. Подтверждено двукратное увеличение содержания VEGFA и PDGF в сфероидах, полученных как из ММСК жировой ткани, так и из костного мозга, по сравнению с клетками, выращенными в монослое.

Чтобы оценить эффективность, использовали модель механической полнослойной раны кожи на мышцах Balb/c. Суспензию сфероидов ММСК вводили подкожно по периметру раны, которую затем закрывали повязкой Tegaderm (3М, США). Установлено, что инъекция сфероидов способствовала сокращению площади раны в 2 раза по сравнению с контрольной группой, которым вводили фосфатно-буферный раствор. Гистологический анализ на 7-й день показал отсутствие плотной рубцовой ткани, воспалительный инфильтрат присутствует в слабой или умеренной степени. По результатам оценки содержания цитокинов и факторов роста в тканях определено снижение провоспалительного IL-1 $\beta$ , а также увеличение PDGF, стимулирующего регенеративные процессы.

Таким образом, инъекция сфероидов ММСК способствует ускорению заживления механических травм.

\* Работа поддержана Фондом содействия инновациям (договор №16245ГУ/2021).

© М. В. Волкова, М. О. Соколова, В. В. Бояринцев, А. В. Трофименко, Г. И. Фильков, 2022

**Литература**

1. Здравоохранение в России. 2021: стат. сб. М.: Росстат, 2021. 171 с.
2. Домарацкая Е. И., Паюшина О. В. Перспективы использования мезенхимных стромальных клеток для регенерации поврежденной кожи // *Успехи современной биологии*. 2017. Т. 137, № 1. С. 56–69.
3. Maqsood M. et al. Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine // *Life Sci*. 2020. Т. 256. С. 118002.
4. Song N., Scholtemeijer M., Shah K. Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential // *Trends Pharmacol. Sci*. 2020. Т. 41, № 9. С. 653–664.
5. Murphy K. C. et al. Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids // *J.R. Soc. Interface*. 2017. Т. 14, № 127. С. 20160851.
6. Durymanov M. O. et al. Methodological approaches to development of cell-based medicinal product for treatment of patients with cold injury in the Arctic // *Human Physiol*. 2020. Т. 46, № 7. С. 798–805.
7. Cesarz Z., Tamama K. Spheroid culture of mesenchymal stem cells // *Stem Cells Int*. 2016. Т. 2016.
8. Bauman E. et al. Xeno-free pre-vascularized spheroids for therapeutic applications // *Sci. Rep*. 2018. Т. 8, № 1. С. 1–13.
9. Volkova M. V. et al. Adaptation of Bio-Layer Interferometry for Quantitative Assessment of the Vascular Endothelial Growth Factor Content in Cell-Conditioned Culture Medium // *Biophysics*. 2020. Т. 65, № 6. С. 935–941.
10. Soleimani M., Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow // *Nat. Protocols*. 2009. Т. 4, № 1. С. 102–106.
11. Долганова О. М. Получение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани // *Инновационная наука*. 2021. № 11-1. С. 138–140.

## ИНДИВИДУАЛЬНОЕ ВОСПРИЯТИЕ ВКУСА СТЕВИИ У ЛЮДЕЙ

Е. Е. Воробьева, В. А. Бортникова

*Кемеровский государственный университет*

✉ 89515923860k@gmail.com

### Аннотация

Сладкий — это один из базовых и приятных вкусов, определяющийся специальными генами рецепторов *TAS1R2* и *TAS1R3*. Стевия обладает сладким вкусом и не ведет к риску возникновения сахарного диабета за счет отсутствия глюкозы и фруктозы, но многим людям она неприятна на вкус. Знание белков рецепторов позволило создать функциональные продукты питания в соответствии с индивидуальными предпочтениями людей.

Рецепторы сладкого вкуса играют важную роль в восприятии питательных веществ и всасывании сахара — обоих процессах, необходимых для получения энергии и поддержания нормального метаболизма. Когда рецепторы сладкого вкуса ощущают сахар, они вызывают выброс гормонов кишечника. Один из таких гормонов, глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1), отвечает за облегчение всасывания глюкозы в кровоток, усиление секреции инсулина в поджелудочной железе и регулирование аппетита. Нарушение любого из этих физиологических процессов может привести к развитию диабета II типа. Рецепторы кодируют соответствующие гены, полиморфизм которых меняет чувствительность тех или иных белков к различным вкусам. Сладкий вкус — одно из самых приятных ощущений. Цель рецепторов сладкого вкуса — обнаружить высококалорийные сахара для приема внутрь. Гены, отвечающие за репертуар рецепторов к сладким веществам, известны как *TAS1R2* и *TAS1R3* [1]. Чувствительные к сладкому вкусу клетки 2-го типа экспрессируют рецепторы класса C — рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), *T1R2 + T1R3*. GPCR — это повсеместный класс белков, которые обнаруживают внеклеточные сигналы и передают эту информацию клетке [2]. Рецептор *TAS1R2* может реагировать на натуральные сахара, сахарозу и фруктозу, а также на некоторые искусственные сахара [3]. Исследования, проведенные на крысах, показывают, что рецепторы не могут отвечать на многие другие природные и искусственные сахара, что предполагает наличие более одного типа рецепторов сладкого вкуса. *TAS1R2* также может связываться с G-белком. Несколько исследований подтверждают, что *TAS1R2* также активируют другие белки, которые могут влиять на рецепторы сладкого вкуса человека. Обнаружено, что полиморфизм гена рецептора сладкого вкуса *TAS1R2* связан с более низкой чувствительностью к сахару и более высоким потреблением сахара среди людей с избыточным весом [3]. Устранение же любого из рецепторов ведет к снижению или полной потере восприятия вкусов [4]. В последнее время в мире идет прирост числа заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, в том числе жиров и углеводов, которые обуславливают иммунодефицит и прочие реакции организма человека. Листья стевии имеют сладкий вкус, потому что в них находятся низкокалорийные вещества — дитерпеновые гликозиды, тип ent-каулены. Гликозиды имеют общее название «стевиозид». При употреблении стевиозида в организме не происходит выброса инсулина, что позволяет существенно снизить дозы инсулина у инсулинозависимых диабетиков. Также стевиозид препятствует развитию гипогликемических и гипергликемических состояний у больных диабетом [5]. Производство продуктов функционального питания с пониженным содержанием сахара может стать одним из самых актуальных и правильных решений проблемы.

### Литература

1. Lopez R., Omar O., Panduro A., Martinez-Lopez E., Roman S. Sweet Taste Receptor TAS1R2 Polymorphism (Val191Val) Is Associated with a Higher Carbohydrate Intake and Hypertriglyceridemia among the Population of West Mexico // *Nutrients*. 2016. Vol. 8. P. 101–113.
2. Yoshida R., Yasumatsu K., Ninomiya Y. The sweet taste receptor, glucose transporters, and the ATP-sensitive K<sup>+</sup> (KATP) channel: sugar sensing for the regulation of energy homeostasis // *Curr. Opin. Physiol.* 2021. Vol. 20. P. 57–63.
3. Habberstad C., Drake I., Sonestedt E. Variation in the Sweet Taste Receptor Gene and Dietary Intake in a Swedish Middle-Aged Population // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017. Vol. 8. P. 348–354.
4. Lee A. A., Owyang C. S. Sweet Taste Receptors and Brain Responses // *Nutrients*. 2017. Vol. 7, № 9. P. 653–665.
5. Bundgaard A. C. C., Rafiq S., Jeppesen P. B. Effect of Steviol Glycosides on Human Health with Emphasis on Type 2 Diabetic Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials // *Nutrients*. 2019. Vol. 11, № 9. P. 1965.



## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СУХОЖИЛИЙ КРЫС\*

К. А. Ворона, А. К. Юферова, И. В. Курилов

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ allekss1982@mail.ru

### Аннотация

Традиционно считалось, что сухожилия содержат только теноциты, резидентные клетки внутри сухожилий. Однако недавнее исследование показало, что сухожилия человека и мыши также имеют стволовые клетки, называемые «стволовые клетки сухожилий» (ТСК), которые играют ключевую роль в развитии сухожилий, гомеостазе и регенерации поврежденных тканей. В отличие от теноцитов, преобладающих резидентных клеток в сухожилиях, эти клетки обладают способностью к самообновлению и мультидифференцировке. Благодаря этим отличительным свойствам стволовые клетки сухожилий могут играть решающую роль в физиологии сухожилий, а также при таких патологиях, как тендинопатия — распространенном хроническом повреждении сухожилий. Несмотря на эти биологические свойства, ТСК остаются в значительной степени неисследованными. Кроме того, отсутствие специфических клеточных маркеров для стволовых клеток сухожилий затрудняет идентификацию *in vitro*. В данном исследовании изучалась возможность выделения стволовых клеток сухожилий и их дифференцировка.

### Материалы и методы

Стволовые клетки были получены из ахиллова сухожилия (АТ) новорожденных крыс путем эксплантации. Животных сначала усыпляли 5%-й смесью «воздух — изофлуран» (Kagizo, Испания). Затем был проведен стерильный отбор проб АТ-ткани. После удаления сухожильной ткани биоптаты трижды промывали в фосфатном буферном растворе (PBS, PanEco, Россия), а затем измельчали лезвием скальпеля. Кусочки ткани раскладывали на чашке Петри в небольшом количестве жидкости и культивировали в течение 2 ч при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub>. Следя за тем, чтобы адгезия не нарушалась, добавляли питательную среду. После трехдневной инкубации наблюдалась миграция клеток, возникающих из сухожильной ткани. Полученные клетки затем культивировали в  $\alpha$ -среду наряду с 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мм L-глутамин (все от PanEco, Россия). Питательную среду меняли каждые три дня. Иммунофенотипирование стволовых клеток сухожилий при пассаже 4 с помощью цитометрии проводили с использованием следующих антител: SCXA (Abcam, ab58655, США), Теномодулин (Abcam, ab203676, США), Коллаген III (Abcam, ab7778, США), Alpha гладкомышечный актин [1A4] (Abcam, ab7817, США), Эластин (Abcam, ab21610, США), Коллаген IV (Abcam, ab6586, США), Коллаген I (Abcam, ab34710, США), Коллаген II (Abcam, ab79013, США), Vimentin (RV202; Santa Cruz, sc-32322, USA), Oct-3/4 (N-19; Santa Cruz, sc-8628, USA), Sox-2 (Y-17; Santa Cruz, sc-17320, USA), Nanog (H-155; Santa Cruz, sc-33759, США), CD34 (ICO115; Santa Cruz, sc-7324, США), SSEA-4 (MC813; Santa Cruz, sc-59368, США), CD29 (BioLegend, cat №102218, США), CD45 (BioLegend, cat №202205, США), STRO-1 (BioLegend, cat №340104, США) и CD90 (Sony Biotechnology, cat № 1612630, США) в соответствии с протоколами производителей. Результаты оценивали с помощью проточного цитофлуориметра Guava EasyCyte 8HT (Millipore, США).

Дифференцировка проводилась в трех различных направлениях, а именно остеогенном, адипогенном и хондрогенном.

### Результаты

Клетки, выделенные из ахиллова сухожилия крысы в данном исследовании, представляют собой гетерогенную популяцию, потенциально отражающую тенденцию к мультилинейной дифференцировке, экспрессирующую специфические маркеры ткани сухожилия (склеракис, теномодулин) и маркеры взрослых мезенхимальных стволовых клеток (CD 90, CD 29), а также маркеры для эмбриональных стволовых клеток (Nanog, SOX-2). Клетки, выделенные в настоящих экспериментах, также дифференцировались в трех основных направлениях. Согласно полученным данным, небольшое количество выделенных клеток экспрессировало коллаген I — маркер стволовых клеток сухожилий и теноцитов. Подтверждено наличие в преобладающем количестве маркеров, отсутствующих в теноцитах, таких как коллаген III, CD 90, Nanog,  $\alpha$ -SMA и SOX-2. Культивируемые клетки крыс экспрессировали коллаген II в 4-м пассаже. Показано присутствие виментина в стволовых клетках сухожилий крыс. Виментин является одним из цитоскелетных белков, характерных для мезенхимальных стволовых клеток, и обычно используется в качестве маркера теноцитов.

В результате анализа настоящих результатов, в дополнение к имеющейся литературе, сделан вывод, что клетки, выделенные из ахиллова сухожилия крысы, являются ТСК.

\* Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНО-КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА И ПРОЦЕССА РАСПЫЛИТЕЛЬНОЙ СУШКИ НА ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖЕЛАТИНА \*

Р. А. Ворошилин, Э. М. Махамбетов

*Кемеровский государственный университет, Технологический институт пищевой промышленности*

✉ rom.vr.22@mail.ru

### Аннотация

Показан процесс получения желатина из костного сырья крупного рогатого скота методом ферментативно-кислотного гидролиза протеолитическим ферментом и соляной кислотой. Представлены данные по влиянию таких технологических процессов на основные физико-химические показатели конечного продукта.

Желатин — ценный продукт для пищевой, фармацевтической, биотехнологической и косметической промышленности [1]. В работе использовали костное сырье крупного рогатого скота. Измельченное костное сырье обрабатывали соляной кислотой (HCl 1M), в состав которой был внесен фермент пепсин микробного происхождения с ферментной активностью 300 000 ед. Гидролиз исходного сырья проводили при температуре  $27 \pm 2$  °C и отношении массы исходного сырья к объему растворителя 1 : 9 в течение 180 мин (3 ч). pH среды поддерживали в пределах 1,5 ед. Для гидролиза использовали магнитную мешалку ММ-135Н с подогревом, перемешивали среду при 100 об/мин и температуре  $27 \pm 2$  °C. С целью отделения минерального остатка центрифугировали полученный оссеин, а затем промывали деминерализованной водой. Далее очищенный оссеин отправляли на водную экстракцию желатина при температуре 60 °C. Сушку оссеинового раствора проводили на лабораторной распылительной сушке Mini Spray Dryer B-290 (температура 90 °C). На заключительном этапе осуществляли контроль основных физико-химических параметров конечного продукта — желатина. В качестве контроля выступал желатин говяжий, представленный на рынке пищевых ингредиентов.

В таблице даны основные показатели качества контрольного и опытного образца желатина.

### Основные показатели качества исследуемых образцов желатина

Показатель	Контроль	Опытный образец	Нормы ГОСТ 11293-2017
Массовая доля белка, %	$92,4 \pm 0,5$	$93,1 \pm 0,2$	–
Массовая доля влаги, %	$6,95 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,2$	не более 16,0
Массовая доля жира, %	$0,35 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,06$	–
Массовая доля золы, %	$0,3 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,03$	не более 2,0
Прочность геля по Блюму, ед.	$288 \pm 0,5$	$290 \pm 0,7$	от 100 до 300

Если сравнивать результаты основных показателей качества полученных образцов желатина с нормируемыми показателями ГОСТ 11293-2017 на желатин, то предлагаемая технология гидролиза дает возможность произвести желатин с высокими показателями качественных характеристик. Результаты анализа основных показателей качества полученного опытного образца желатина по некоторым показателям превосходят результаты контрольного образца и данные других исследователей. Так, массовая доля белка в полученном образце в среднем больше на 1 %, массовая доля жира ниже в среднем на 0,5 % [2, 3].

Данные исследования подтверждают возможность проведения ферментативно-кислотного гидролиза костного сырья с целью получения качественного продукта — желатина, что позволяет развивать новые ресурсосберегающие способы его производства и новые направления отрасли в целом.

### Литература

1. Bello A. B. et al. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications // *Tissue Eng. Part B: Rev.* 2020. Т. 26 (2). P. 164–180.
2. Al-Hassan A. A. et al. Extraction and characterization of gelatin developed from camel bones // *J. Food Meas. Char.* 2021. Т. 15 (5). P. 4542–4551.
3. Al-Nimry S. et al. Cosmetic, biomedical and pharmaceutical applications of fish gelatin/hydrolysates // *Mar. Drugs.* 2021. Т. 19 (3). P. 145.

\* Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке молодых российских ученых — кандидатов наук (МК-4035.2022.4).

## ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА МИКРОБИОТУ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

О. А. Гасюк, Н. Н. Волченко, А. А. Лазукин, А. А. Самков, А. А. Худокормов

Кубанский государственный университет, Краснодар

✉ olgagasyuk2000@yandex.ru

### Аннотация

В настоящее время окружающая среда страдает от сильной антропогенной нагрузки. Для решения этой проблемы совершенствуются существующие и создаются новые технологии в очистке окружающей среды. Микробные топливные элементы (МТЭ) являются перспективными биотехнологическими устройствами, которые могут использоваться для мониторинга и очистки окружающей среды. Для этого необходимо исследовать влияние различных поллютантов на микробиоту МТЭ и, соответственно, их электрогенную способность.

В настоящее время одна из глобальных экологических проблем человечества — загрязнение окружающей среды. Разнообразные поллютанты (фосфаты, СПАВы, тяжелые металлы и т. д.) постоянно поступают в окружающую среду в различных количествах. Поэтому важной задачей является создание новых способов очистки окружающей среды.

Микробные топливные элементы — перспективные биотехнологические устройства. Одним из активно развивающихся направлений применения МТЭ является их использование в процессах мониторинга и очистки окружающей среды. Для достижения наибольшей эффективности в процессах ремедиации необходимо проводить исследования для выяснения влияния поллютантов на микробиоту МТЭ, что определяет электрогенез данных устройств.

В процессе исследования применялись МТЭ донного типа с горизонтальными и вертикальными электродами. Electrodes изготовливались из графитовых стержней и углеродного войлока «Карбопон». Анодный электрод пропитывался суспензией электрогенной культуры *Shewanella oneidensis* MR-1 (ВКПРМ № В-9861). В качестве поллютантов использовались  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Ni^{2+}$  в концентрации 7 ПДК для иона каждого металла.

Оценка влияния тяжелых металлов на микробную биомассу МТЭ осуществлялась по количеству белка в пробах, а определение концентрации белка — при помощи набора *Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)*. Пробы отбирались в трех участках МТЭ и имели следующую условную нумерацию: 0 — поверхностная жидкая фаза; 1 — проба из грунта на глубине 1 см параллельно аноду (горизонтальные электроды) / на 1 см от края емкости параллельно аноду (вертикальные электроды); 2 — проба из грунта в области анодного электрода. Первые пробы были взяты через 7 дней после начала эксперимента.

В присутствии  $Pb^{2+}$  в МТЭ с горизонтальными электродами наибольшее содержание белка обнаружено в пробе № 2 (902,0 мг/л), в МТЭ с вертикальными электродами — в пробе № 2 (1318,2 мг/л). Так, в обоих МТЭ наибольший показатель микробной биомассы был выявлен в области анода.

В присутствии  $Ni^{2+}$  в МТЭ с горизонтальными электродами наибольшие показатели белка диагностированы в пробе № 1 (1892,9 мг/л), в МТЭ с вертикальными электродами пробы № 1 и 2 имеют равные показатели (3104,2 мг/л). Таким образом, в присутствии солей никеля наибольшая концентрация микробной биомассы выявлена в донной фазе (между электродами).

В присутствии  $Cu^{2+}$  в МТЭ с горизонтальными электродами наибольшее количество белка установлено в пробе № 2 (1774,8 мг/л), в МТЭ с вертикальным электродом — в пробе № 2 (1748,2 мкг/мл). Так в МТЭ с солями меди наибольший показатель микробного белка был выявлен в области анода.

Следующий отбор проб производился спустя 3 месяца эксперимента. Так в МТЭ с  $Pb^{2+}$  и горизонтальными электродами наибольшие показатели белка обнаружены в пробе № 2 (1403,3 мг/л), в МТЭ с вертикальными электродами — в пробе № 2 (368,7 мг/л). Наибольшая микробная концентрация сохраняется в анодной области, как и в начале эксперимента. Однако по сравнению с началом эксперимента концентрация белка в МТЭ с горизонтальными электродами в пробе № 2 возросла.

В МТЭ в присутствии  $Ni^{2+}$  и с горизонтальными электродами наибольшее количество белка выявлено в пробе № 1 (368,7 мг/л), а в МТЭ с вертикальными электродами — в пробе № 1 (297,4 мг/л). В результате наибольшая микробная концентрация сохраняется в донной фазе.

В присутствии  $Cu^{2+}$  наибольшая концентрация белка в МТЭ с горизонтальными электродами диагностирована в пробе № 2 (642,3 мг/л), в МТЭ с вертикальными электродами — в пробе № 1 (362,3 мг/л). В данном случае наибольшая концентрация белка в разных МТЭ распределилась в зависимости от типа электрода.

В результате анализа динамики белка по истечению 90 суток самые незначительные скачки снижения белка выявлены в МТЭ с солями свинца, независимо от типа электрода. Это может говорить о менее губительном воздействии на микробиоту МТЭ.

**ИЗУЧЕНИЕ РОСТОВЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ГЕНОМНОМ НОКАУТЕ ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ *BAH*, *BAK1* И ОВЕРЭКСПРЕССИИ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО ФАКТОРА *BCL-2* И ИНДУКТОРА АУТОФАГИИ *BECLIN-1*, И РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПРОДУЦЕНТА, ПОЛУЧЕННОГО НА БАЗЕ ЭТИХ КЛЕТОК**

Е. А. Гаямова<sup>1</sup>, С. В. Ковнир<sup>1</sup>, Л. К. Даянова<sup>1,2</sup>, Н. А. Орлова<sup>1</sup>, И. И. Воробьев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии им. К. Г. Скрябина, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ elizavetagaiam@gmail.com

**Аннотация**

Методом редактирования генома CRISPR/Cas9 из клеток линии CHO получена линия CHO-4BGD с гомозиготным нокаутом генов *bax*, *bak1*, *dhfr*, *glul* и оверэкспрессией генов *bcl-2*, *beclin-1*. В данной работе представлены результаты по изучению ростовых свойств линии клеток CHO-4BGD и продуцента, полученного на основе этой линии. Установлено, что и сами клетки линии CHO-4BGD, и этот продуцент способны к длительному росту без замены культуральной среды. Для клеток линии CHO-4BGD показано увеличение интегральной клеточной плотности в 2 раза по сравнению с интактными клетками CHO-S и в 5 раз по сравнению с клетками линии CHO-DG44 с гомозиготным нокаутом гена *dhfr*.

Одни и те же клеточные стрессы могут индуцировать апоптоз и аутофагию, конкурирующие процессы реакции клеток на внешнее воздействие. Процесс макроаутофагии развивается как выживание клетки в условиях дефицита нутриентов за счет утилизации части органелл. Процесс индукции апоптоза по внутреннему (митохондриальному) пути опосредуется в первую очередь многодоменными проапоптотическими белками *Bax* (BCL2 associated X) и *Bak* (BCL2 antagonist/killer 1). Клетки с дефицитом или отсутствием белков *Bax* и *Bak* устойчивы к широкому спектру проапоптотических стимулов. Антиапоптотический белок *Bcl-2* блокирует конформационные изменения *Bax*, *Bak* и других проапоптотических факторов, а также связывается в комплекс с белком *Beclin-1*, промотирующим рост аутофагосом. Регуляция взаимодействия между *Bcl-2* и *Beclin-1* является центральным механизмом, который включает или выключает аутофагию в ответ на разнообразные клеточные стимулы. Предполагаем, что одновременный нокаут генов *bax*, *bak1* и повышение уровня белков *Bcl-2*, *Beclin-1* в клетках CHO позволит существенно увеличить их плотность в суспензионной культуре и время культивирования до потери жизнеспособности при периодическом культивировании.

Нокаут генов *bax*, *bak1* проведен при помощи системы CRISPR/Cas9, а оверэкспрессия *Bcl-2* и *Beclin-1* — с использованием пары плазмид с промотором гена *EEF1A1* китайского хомячка и селекционных маркеров устойчивости к гигромицину и зеоцину. Среди полученных клонов клеток отобран CHO-4BGD с максимальной скоростью деления, для него подтверждено отсутствие интактных аллелей генов *bax*, *bak1* и присутствие в геноме генетических кассет, кодирующих *Bcl-2* и *Beclin-1*.

Для изучения и сравнения ростовых свойств полученных клеток проведена длительная культивация без добавления глюкозы линий CHO-4BGD (*bak1*<sup>-/-</sup> *bax*<sup>-/-</sup> *bcl-2*<sup>+</sup> *beclin-1*<sup>+</sup> *glul*<sup>+/+</sup> *dhfr*<sup>-/-</sup>), CHO-S, CHO-DG44 (*dhfr*<sup>-/-</sup> вариант линии клеток CHO-K1), а также линий CHO, полученных в нашей лаборатории ранее — 10/22 с гомозиготным нокаутом генов *bax*, *bak1*, *glul*, гетерозиготным нокаутом гена *dhfr* и линия A11 с гомозиготным нокаутом гена *dhfr*. Для линии A11 без замены культуральной среды процент выживаемости упал ниже 50 % на 8-й день культивации, для линии CHO-S — на 10-й день, для линии CHO-DG44 — на 12-й день, для линии 10/22 — на 15-й день и для линии CHO-4BGD — на 16-й день. Интегральная клеточная плотность составила для линии A11  $15 \pm 1$  млн/мл, для линии CHO-DG44 —  $16 \pm 1$  млн/мл, для линии CHO-S —  $41 \pm 2$  млн/мл, для линии 10/22 —  $58 \pm 2$  млн/мл и для линии CHO-4BGD —  $78 \pm 4$  млн/мл. Таким образом, установлено, что линии с нокаутом генов *bax*, *bak1* способны дольше сохранять жизнеспособность при длительной культивации без замены среды. Оверэкспрессия *Bcl-2* и *Beclin-1* действует аддитивно к нокауту *bax*, *bak1*, для такой клеточной линии интегральная клеточная плотность увеличивается еще на 34 % за период длительной культивации без добавления питательных веществ.

На базе линии клеток CHO-4BGD был получен продуцент моноклонального антитела человека. Проведена длительная культивация продуцента с добавлением глюкозы по мере исчерпания. На момент 21-го дня длительной культивации без замены среды процент выживаемости клеток составил 58 %. Это позволяет говорить о том, что преимущества линии CHO-4BGD сохраняются у линий-продуцентов, полученных на базе этой линии.

**Литература**

1. Fan Y. J., Zong W. X. The cellular decision between apoptosis and autophagy // *Chin. J. Cancer*. 2013. Vol. 32 (3). P. 121–129.
2. Jae Seong Lee, Tae Kwang Ha, Jin Hyoung Park, Gyun Min Lee. Anti-Cell Death Engineering of CHO Cells: Co-Overexpression of Bcl-2 for Apoptosis Inhibition, Beclin-1 for Autophagy Induction // *Biotechnol Bioeng*. 2013. Vol. 110 (8). P. 2195–2207.
3. Орлова Н. А., Даянова Л. К., Гаямова Е. А. и др. Направленная инактивация генов *dhfr*, *glul*, *bak1*, *baх* методом мультиплексного геномного редактирования клеток CHO // *Докл. РАН. Науки о жизни*. М., 2022. Т. 502. С. 54–59.
4. Ковнир С. В., Даянова Л. К., Гаямова Е. А. и др. Нокаут генов *ВАХ*, *ВАК1* и избыточная экспрессия *BCL2*, *BECN1* увеличивают время жизни и максимальную плотность культуры клеток CHO-S // *Биотехнология*. М., 2022. Т. 38, № 4 [в печати].

## ПРИМЕНЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ *LACTOBACILLUS BREVIS*\*

М. А. Германова, А. Д. Риккинен, П. О. Ляшков

Петрозаводский государственный университет

✉ marinagermanova12@yandex.ru

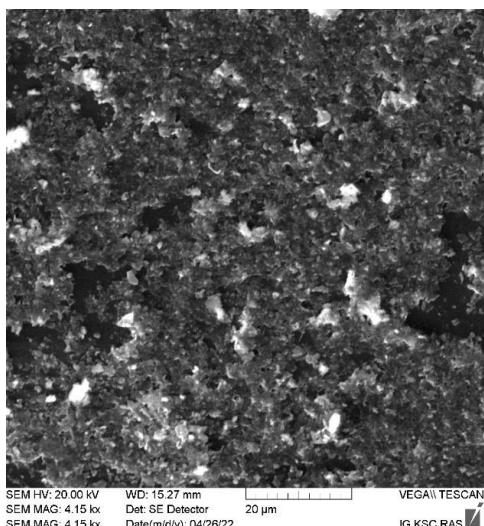
### Аннотация

Изучена возможность использования нанонитей поливинилпирролидона (ПВП) в качестве специфических скаффолдов для иммобилизации *Lactobacillus brevis*. Нанонити получены методом электроспиннинга. Культивирование и оценка кинетики роста бактерий в микроструктуре скаффолда выполнена с помощью биореактора RTS-1С, Biosan. В результате применения нанонитей PVP обнаружен феномен ортокинетики флокуляции, образование биопленки лактобактериями.

Актуальность исследования обусловлена оптимизацией иммобилизованных форм пробиотиков на основе молочнокислых бактерий. В качестве специфического скаффолда или межклеточной субстанции, обеспечивающей прикрепление, рост и метаболическую активность микробных клеток, использованы нанонити поливинилпирролидона  $C_6H_9NO$  (ПВП). Выбор основы для скаффолда связан с качественными характеристиками полимера, которые соответствуют требованиям, предъявляемым к носителям для иммобилизации: биосовместимость, отсутствие токсичности, доступность, низкая стоимость. Физико-химические свойства ПВП придают дополнительные особенности пробиотическим культурам: жизнеспособность, метаболическую стабильность и способность вызывать пролонгированный эффект. При создании скаффолда применен метод электроспиннинга, который является наиболее доступным, отличается простотой работы с установкой и возможностью регулирования технологических параметров. В качестве пробиотической культуры для иммобилизации выбран штамм *Lactobacillus brevis* 2 k.Gv в дозе  $10^9$  КОЕ/мл, выделенный из природной среды обитания. Для культивирования иммобилизованных клеток лактобактерий использован биореактор RTS-1С, Biosan с программным обеспечением и функцией мониторинга роста микроорганизмов в режиме реального времени. Эффект иммобилизации оценивали по морфологическим и культуральным признакам *L. brevis*, количеству жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), продолжительности лаг-фазы, изменению  $\mu$  ( $ч^{-1}$ ) и OD культурального раствора.

В результате выполненных исследований обнаружено, что в присутствии наноструктурированного высокомолекулярного полимера происходит самоагрегация клеток лактобактерий за счет ортокинетики флокуляции. В процессе самоагрегации флокуляцией увеличивается механическая прочность флокул и создается многофакторная система, обеспечивающая прикрепление и рост клеток на границе раздела фаз «жидкость — флокулят». На поверхности раздела фаз иммобилизованные клетки находятся в зоне повышенной концентрации физиологически активных веществ, удерживаются путем адгезии к матрице и размножаются на ней, образуя биопленку (см. рисунок).

На препаратах по Граму *L. brevis* окрашивались грамположительно, имели форму коротких и прямых палочек размером  $0,8 \times 3,0$  мкм. На агаризованной среде MRS образовывали плоские, непрозрачные колонии без пигмента. Продолжительность лаг-фазы зависела от физиологического состояния клеток и составила 13,5 ч, удельная скорость роста —  $0,12$   $ч^{-1}$ . Средние значения количества жизнеспособных иммобилизованных клеток лактобактерий в составе биопленки достигали  $6,9 \pm 0,4 \times 10^8$  КОЕ/мл. Величина оптической плотности (OD) культурального раствора соответствовала 1,3 е.о.п. Благодаря полученным результатам можно предположить, что применение наноразмерных скаффолдов на основе ПВП является перспективным методом для совершенствования технологии иммобилизации пробиотически значимых культур микроорганизмов.



Электронная фотография биопленки *L. brevis* в присутствии наноструктурированного высокомолекулярного полимера

\* Работа выполнена в рамках реализации Программы поддержки НИОКР студентов и аспирантов ПетрГУ, финансируемой Правительством Республики Карелия.

## МОДИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОВОДЯЩИМ ПОЛИМЕРОМ ПЭДОТ : ПСС/ПЭГДЭ В СОСТАВЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

А. В. Гоглова<sup>1</sup>, А. Г. Быков<sup>2</sup>, А. Е. Китова<sup>2</sup>, Н. А. Кленова<sup>1</sup>, А. Н. Решетилов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С. П. Королева

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»

✉ anggoglova@gmail.com

### Аннотация

Бактериальная целлюлоза (БЦ) — перспективный материал для иммобилизации биокатализаторов. В работе представлены амперометрические биосенсоры двух типов, основой рецепторных элементов которых являлась БЦ. Изучено изменение основных аналитических характеристик биосенсоров при модификации БЦ проводящим полимером ПЭДОТ : ПСС/ПЭГДЭ. Полученный композит улучшил иммобилизующие свойства и увеличил чувствительность биосенсоров к глюкозе.

Бактериальная целлюлоза — гомополисахарид, продуцируемый бактериями и характеризующийся высокой степенью полимеризации, механической прочностью, пластичностью, высокой влагоудерживающей способностью и наноструктурной организацией [1, 2]. Помимо этого, БЦ является химически чистым, биосовместимым и биоразлагаемым веществом [3].

Бактериальная целлюлоза может использоваться во многих областях: в медицинской, текстильной, пищевой и др. [1, 4]. В биотехнологии БЦ применяется в качестве матрицы для иммобилизации ферментов, клеток и тканей на электроде. Добавление в композицию из БЦ дополнительных проводящих материалов и различных гелей может улучшить ее проводимость. Одним из таких высокопроводящих полимеров (ВП) является ПЭДОТ : ПСС/ПЭГДЭ (поли(3,4-этилендиокситиофен)полистиролсульфонат / (полиэтиленгликоль)диглицеридиловый эфир), который обладает электрической проводимостью, химической стабильностью и высокой биосовместимостью [5].

**Цель данной работы** — исследование возможности улучшения аналитических параметров биосенсора на основе бактериальной целлюлозы при его модификации высокопроводящим полимером ПЭДОТ : ПСС/ПЭГДЭ.

Для получения БЦ использовали штамм-продуцент *Gluconacetobacter sacrofermentas* ВКПМ В-11267. Для оценки каталитической активности бактериальных клеток, иммобилизованных в бактериальной целлюлозе, применяли графитовые 3-контактные печатные электроды (ООО «КолорЭлектроникс», Россия) и кислородный электрод типа Кларка (ООО «Кронас», Россия). Поверхность печатных электродов модифицирована слоем терморасширенного графита (ТРГ), на него сверху наносилась пленка БЦ, на которую иммобилизовали *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280.

В изучаемой композиции БЦ играла роль трехмерной матрицы для эффективной иммобилизации биокатализатора, в качестве которого выступали бактерии. ВП использовался для увеличения низкой проводимости БЦ. Важно было оценить негативные эффекты компонентов системы на дыхательную активность бактериальных клеток, для этого применялся кислородный электрод типа Кларка (рис. 1).

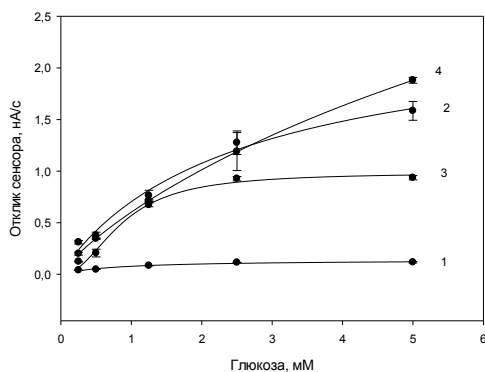


Рис. 1. Калибровочные зависимости биосенсоров на основе кислородного электрода типа Кларка с различными модификациями рецепторного элемента

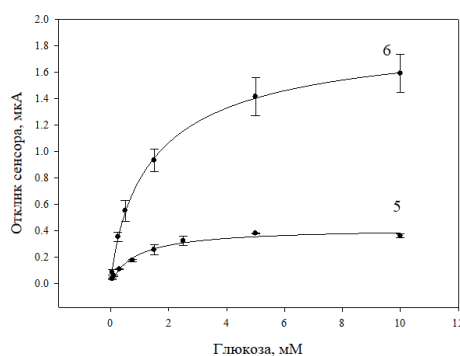


Рис. 2. Калибровочные зависимости биосенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных ТРГ

Также важным было исследовать влияние ВП на особенности электронного переноса от бактерий на поверхность графитовых электродов (рис. 2). Для этого сформировали 2 макета биосенсора для определения глюкозы. Бактериальные клетки были иммобилизованы на поверхности рабочих электродов в матрицу БЦ, модифицированную и не модифицированную ВП.

Данные с калибровочных зависимостей были аппроксимированы трехпараметрическим уравнением Хилла (см. таблицу).

#### Аналитические характеристики биосенсоров

Номер модификации электрода	Основа рецептора	$V_{max}$	$K_m$ , мМ	Нижний предел детекции, мМ	Диапазон детекции, мМ	Линейный диапазон, мМ
1	БЦ	0,14 нА/с	0,82	0,25	0,25–5	0,25–1,51
2	БЦ + ВП	2,49 нА/с	2,67			0,47–1,69
3	GF	0,98 нА/с	0,86			0,63–0,07
4	GF + ВП	6,8 нА/с	15,6			0,29–0,45
5	БЦ	0,42 мкА	0,89	0,05	0,05–5	0,05–0,50
6	БЦ + ВП	1,93 мкА	1,56			0,05–0,50

Эффект увеличения сигнала на кислородном электроде при добавлении ВП может быть связан с повышением скорости прохождения растворенного кислорода через композит. Кроме того, ВП оказывает положительное влияние на аналитические характеристики биосенсора на основе печатного электрода, увеличивая чувствительность к глюкозе в 4,7 раза.

#### Литература

1. Рассказова П. М. Бактериальная целлюлоза: получение и возможности практического применения // Химия: достижения и перспективы: сб. науч. ст. по материалам V Всерос. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых. 2020. С. 274–275.
2. Khattak S., X. Qin F., Wahid L. et al. Permeation of Silver Sulfadiazine Into TEMPO-Oxidized Bacterial Cellulose as an Antibacterial Agent // *Frontiers Bioeng. Biotechnol.* 2021.
3. Гладышева Е. К., Скиба Е. А. Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* // Вестн. Воронеж. гос. ун-та инж. технологий. 2015. № 3 (65). С. 149–156.
4. Громов Д. А. Изучение возможности выделения бактериальной целлюлозы из культуры *Medusomyces gisevii* // Науч. исслед. высш. шк: сб. ст. VI Междунар. науч.-практ. конф. 2021. С. 15–18.
5. Решетилов А. Н., Китова А. Е., Тарасов С. Е. и др. Высокопроводящий полимер ПЭДОТ : ПСС — применение в био-медицинских и биоэлектрохимических системах // РЭНСИТ. 2020. № 12 (4). С. 471–482.



## ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ \*

С. Д. Головки, Л. В. Устюжанинова

Вятский государственный университет, Киров

✉ sergey.golovko.work@mail.ru

**Аннотация**

В ходе исследований получены пленки бактериальной целлюлозы на среде NS при температурах ферментации 25; 28 и 30 °С из культуры, выделенной с чайного гриба. Обнаружено, что при 28 °С выход бактериальной целлюлозы оказался выше.

Бактериальная целлюлоза (БЦ) — перспективный наноматериал, продуцируемый бактериями. По химическому составу он представляет собой линейный полимер молекул глюкозы, соединенных β-1,4 связями, имеет высокую кристалличность (около 95–98 %) и водоудерживающую способность. Этот материал широко применяется в различных отраслях промышленности: пищевой, биотехнологической, химической, целлюлозно-бумажной, а также в медицине [1].

На данный момент производство БЦ-пленок ограничено из-за их сравнительно низкого выхода относительно средств, затраченных на производство, что приводит к их высокой стоимости [1].

Для образования целлюлозных пленок используются культуры рода *Gluconacetobacter*, семейства Acetobacteraceae, видов *G. xylinus* и *G. hansenii*, которые способны синтезировать больше БЦ, чем представители других родов [2].

Получение бактериальных пленок происходит в несколько этапов [3].

1. Подготовка субстрата с заданными характеристиками.
2. Подготовка культуры продуцента.
3. Стадия основной ферментации, когда происходит синтез БЦ бактериями.
4. Стадия очистки, когда пленки собирают и очищают от клеток и компонентов среды.
5. Стадия сушки: при помощи печи, при комнатной температуре или лиофильно.

Образцы БЦ получены в результате пересева культур бактерий с чайного гриба на среду NS и культивирования при температурах 25; 28; 30 °С.

Среда NS имела следующий состав (г/л): глюкоза — 20,0; пептон — 5,0; дрожжевой экстракт — 5,0; диэтилфосфат (безводный) — 2,7; лимонная кислота (моногидрат) — 1,15, pH 5,0–6,0.

С трех образцов чайного гриба, культивируемых при температурах 25; 28; 30 °С, брали 2,5 мл культуральной жидкости и переносили в колбы Эрленмейера на 250 мл, содержащие 50 мл среды NS. Посевы культивировали в течение 7 суток в статических условиях в термостатах при температурах 25; 28; 30 °С соответственно. После ферментации образовавшиеся пленки БЦ доставали при помощи пинцета и помещали в чашки Петри. Очистку БЦ проводили обработкой 0,1 Н раствором NaOH при 100 °С в течение 20 мин. После этого БЦ промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH. Сушили пленки при 60 °С в течение 24 ч в приоткрытой чашке Петри. Для определения влажности пленок использовали анализатор влажности Sartorius MA30, далее рассчитывали концентрацию БЦ (см. таблицу).

**Результаты анализа пленок БЦ, полученных при ферментации культуры из чайного гриба на среде NS**

Температура культивирования при получении БЦ, °С	Масса подсушенной пленки БЦ, г	Влажность пленки БЦ, %	Концентрация БЦ, г/л (в пересчете на сухое вещество)
25	0,217	17,81	3,5
28	0,432	18,16	7,1
30	менее 0,100	Не удалось измерить, так как масса пленки менее 0,1 г	–

В ходе лабораторных исследований было выяснено, что культура, полученная из чайного гриба, лучше производит БЦ на среде NS при 28 °С. Это может быть связано с тем, что в состав ассоциации чайного гриба часто входят бактерии вида *G. xylinus*, которые способны синтезировать наибольшее количество БЦ при 28 °С [1].

\* Исследования выполнены при поддержке гранта № 17851ГУ/2022, предоставляемого Фондом содействия инновациям в рамках проекта «УМНИК».

**Литература**

1. Kadier A., Ilyas R. A., Huzaifah M. R. M. et al. Use of Industrial Wastes as Sustainable Nutrient Sources for Bacterial Cellulose (BC) Production: Mechanism, Advances, and Future Perspectives // *Polymers*. 2021. P. 33–65.
2. Isabela de Andrade Arruda Fernandes, Alessandra Cristina Pedro, Valéria Rampazzo Ribeiro et al. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 164. P. 2598–2611.
3. Ioana M. Bodea, Florin I. Beteg, Carmen R. Pop et al. Optimization of Moist and Oven-Dried Bacterial Cellulose Production for Functional Properties // *Polymers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 19. P. 33–65.

## ИЗУЧЕНИЕ АДСОРБЦИИ ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ НЕСООТВЕТСТВИЯ, НА НАНОЧАСТИЦАХ ЗОЛОТА

Е. А. Горбунова, А. В. Епанчинцева, И. А. Пышная

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

✉ gorbunova-ekaterina@inbox.ru

### Аннотация

Известно, что сродство одноцепочечной (оц) ДНК к наночастицам золота (НЧЗ) выше, чем двухцепочечной (дц) ДНК. Проведено изучение закономерностей нековалентной адсорбции ДНК-дуплексов различной топологии на поверхность НЧЗ. Показано, что процесс взаимодействия НЧЗ с дуплексами ДНК сопровождается их диссоциацией и конкурентной адсорбцией отдельных цепей ДНК на НЧЗ; решающим фактором эффективности адсорбции является аффинность оцДНК к НЧЗ.

НЧЗ — одна из ключевых платформ для разработки систем внутриклеточной доставки терапевтических нуклеиновых кислот и колориметрических сенсоров. Ранее в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН была изучена нековалентная адсорбция оцДНК на НЧЗ в условиях низкой ионной силы [1]. При этом процесс адсорбции дцДНК на НЧЗ в литературе описан скупо. Это является фундаментальной проблемой, поскольку системы внутриклеточной доставки малых интерферирующих РНК (siРНК) для подавления экспрессии целевого гена должны обеспечивать транспорт внутрь клетки именно дуплекса РНК, а в сенсорах, направленных на определение ДНК-мишеней, важно взаимодействие этой мишени с комплементарными ей зондами на поверхности НЧЗ.

Цель работы — исследование закономерностей нековалентного взаимодействия сферических НЧЗ и ДНК-дуплексов (20 п. н.), в том числе содержащих оц-нависания с разной нуклеотидной последовательностью, в условиях низкой ионной силы. Нависания, состоящие из одного, двух или четырех высокоаффинных к НЧЗ TTGTTG- или TTTTTT- мотивов [2], располагались на 3'-конце ДНК-цепей.

Эффективность адсорбции оцДНК и дцДНК на НЧЗ оценивали по интенсивности излучения Вавилова — Черенкова. Установлено, что высокоаффинный мотив служит якорем и обеспечивает компактное размещение олигонуклеотида на поверхности НЧЗ (до  $98 \pm 2$  молекул на НЧЗ). Однако при увеличении длины «якоря» эффективность загрузки оцДНК на НЧЗ падает. В то же время включение высокоаффинного мотива длиной 6–24 н. в состав олигонуклеотида не повлияло на адсорбцию комплементарного ему олигонуклеотида в ДНК-дуплексе. Ни для одного исследуемого ДНК-дуплекса не наблюдали равной адсорбции обеих цепей. Показано, что и при последовательной, и при одновременной адсорбции ДНК на НЧЗ идет конкуренция процесса ассоциации комплементарных ДНК с адсорбцией оцДНК на НЧЗ.

Выявлено, что при адсорбции оцДНК на НЧЗ подвижность в агарозном геле полученных компактных ассоциатов полностью определяется величиной их отрицательного заряда, который зависит от емкости оцДНК на НЧЗ. Подвижность ассоциатов НЧЗ с дцДНК устанавливается не только зарядом ассоциата, но и его диаметром. Соотношения емкости и подвижности ассоциатов со смесью комплементарных ДНК косвенно могут подтверждать возможность формирования ДНК-дуплексов на поверхности одной НЧЗ или между соседними НЧЗ.

### Литература

1. Epanchintseva A., Vorobjev P., Pyshnyi D., Pyshnaya I. Fast and Strong Adsorption of Native Oligonucleotides on Citrate-Coated Gold Nanoparticles // *Langmuir*. 2018. Vol. 34, № 1. P. 164–172.
2. Vorobjev P., Epanchintseva A., Lomzov A. et al. Dna Binding to Gold Nanoparticles Through the Prism of Molecular Selection: Sequence-Affinity Relation // *Langmuir*. 2019. Vol. 35, № 24. P. 7916–7928.

## ЦИТОХРОМЫ КЛАНА CYP74: ХАРАКТЕРИСТИКА ДИКИХ И МУТАНТНЫХ ФОРМ\*

С. С. Горина, Л. Ш. Мухтарова, Я. Ю. Топоркова, А. Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

✉ gsvetlana87@gmail.com

**Аннотация**

Изменение типа катализа ферментов CYP74 в большей степени зависит от замен аминокислотных остатков, проводимых в сайте «F/L toggle» и в центральной области I-спирали.

Ферменты CYP74 принадлежат к обширной группе цитохромов P450. Однако в отличие от классических монооксигеназ для каталитической активности ферментов CYP74 не требуются молекулярный кислород и окислительно-восстановительные партнеры. Донором кислорода и электронов выступают субстраты — гидроперекиси полиеновых жирных кислот [1, 2]. В настоящее время известны четыре типа клановых ферментов CYP74 (алленоксидсинтаза (АОС), дивинилэфирсинтаза (ДЭС), гидропероксидлиаза (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС)), при участии которых синтезируется обширный спектр биологически активных метаболитов. Ферменты CYP74 наиболее распространены в растениях, где они участвуют в процессах роста и развития, в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды, обеспечивая, таким образом, поддержание гомеостаза [3, 4]. Наряду с высшими растениями, ферменты CYP74 обнаруживаются у мхов (*Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha*), зеленых (*Klebsormidium flaccidum*) и бурых (*Ectocarpus siliculosus*) водорослей, а также у представителей животных (*Nematostella vectensis*, *Branchiostoma floridae*).

Поскольку ферментам CYP74 для катализа не требуется кислород, то аминокислотные остатки, формирующие каталитический центр, отличаются от характерных для монооксигеназ P450. Для установления детерминант катализа ферментов CYP74 проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей. На рисунке представлена часть этого выравнивания.

	«F/L toggle»		участок перегиба I-спирали
			123456
ZmAOS1 (92)	KKDI <b>Q</b> IGTYMPS	(267)	EEACHNLL <b>F</b> ATTFNSYGGGLKVLFFP
LeAOS3 (104)	KENY <b>F</b> EGTFMPS	(283)	DEACHNFV <b>F</b> LAGFNSYGGGLKVFFP
AoDES (93)	KMNTLLGHFTPS	(263)	DEACHNLI <b>F</b> AWISNAYLGVNAYLP
LuDES (98)	KKDTLLGDFMPS	(276)	EEA <b>I</b> HNLL <b>F</b> VLA <b>F</b> NS <b>F</b> FTLFIP
ShHPL (91)	KFNVL <b>D</b> GTYLPS	(269)	DEACHN <b>L</b> V <b>F</b> VAGFNAYGGMKAWLP
CYP74C1_CS (89)	KRN <b>I</b> QIGTYMPS	(267)	EKA <b>C</b> HN <b>L</b> V <b>F</b> LAGFNAY <b>G</b> EMKVLFFP

Множественное выравнивание частичных последовательностей следующих представителей CYP74: ZmAOS1 (*Zea mays*); LeAOS3 (*Lycopersicon esculentum*), AoDES (*Asparagus officinalis*), LuDES (*Linum usitatissimum*), ShHPL (*Sturnira hondurensis*), CYP74C1\_CS (*Cucumis sativus*). Символом ▼ обозначен сайт «F/L toggle», цифрами 1–6 — участок перегиба I-спирали, кружочками обведены аминокислотные остатки, подвергнутые сайт-направленному мутагенезу

На основе проведенного сопоставления выявлены предполагаемые сайты в каталитически важных доменах: в первом субстрат-распознающем сайте (CPC) — «F/L toggle» — и в центральной области I-спирали, расположенной в CPC-4 [5]. Аминокислотные замены в выбранных позициях проводили методом сайт-направленного мутагенеза, очистку диких и мутантных форм ферментов — методом металл-аффинной хроматографии, анализ продуктов реакций — методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Таким образом, наряду с характеристикой новых представителей клана CYP74 (AoDES спаржи [6], ShHPL летучей мыши) за последние годы в ходе наших работ были получены мутантные формы ферментов CYP74 с полной (например, LuDES E292G [7], CYP74C1\_CS G283A/L93F [8]) или частичной (например, LeAOS3 F108L, ZmAOS1 F95L [9]) сменой типа катализа, о чем свидетельствует изменение спектра продуктов на хроматограммах. Наши результаты указывают, что на изменение типа катализа в большей степени влияют замены в сайте «F/L toggle» и в центральной области I-спирали.

\* Работы по биохимической характеристике AoDES проводились при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 20-04-01069). Работы по изучению мутантных форм ферментов CYP74 выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 20-14-00338). Биоинформационный анализ ферментов CYP74 проводился при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук».

**Литература**

1. Brash A. R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes // *Phytochemistry*. 2009. Vol. 70. P. 1522–1531.
2. Toporkova Y. Y., Gorina S. S., Mukhitova F. K. et al. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2017. Vol. 1862. P. 1099–1109.
3. Wasternack C., Feussner I. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function // *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2018. Vol. 69. P. 363–386.
4. Vincenti S., Mariani M., Alberti J.-C. et al. Biocatalytic Synthesis of Natural Green Leaf Volatiles Using the Lipoxygenase Metabolic Pathway // *Catalysts*. 2019. Vol. 9. P. 873.
5. Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 Family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 83–90.
6. Gorina S. S., Mukhtarova L. S., Iljina T. M., Toporkova Y. Y., Grechkin A. N. Detection of divinyl ether synthase CYP74H2 biosynthesizing (11Z)-etheroleic and (1'Z)-colnelenic acids in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) // *Phytochemistry*. 2022. Vol. 200. P. 113212.
7. Toporkova Y. Y., Ermilova V. S., Gorina S. S. et al. Structure-function relationship in the CYP74 family: conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis // *FEBS Lett.* 2013. Vol. 587. P. 2552–2558.
8. Toporkova Y. Y., Gorina S. S., Bessolitsyna E. K. et al. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2018. Vol. 1863. P. 369–378.
9. Toporkova Y. Y., Smirnova E. O., Mukhtarova L. S. et al. Catalysis by allene oxide synthases (CYP74A and CYP74C): Alterations by the Phe/Leu mutation at the SRS-1 region // *Phytochemistry*. 2020. Vol. 169. P. 112152.

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ТРЕХ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ-АНТАГОНИСТОВ ГАСТРИН-РЕЛИЗИНГ ПЕПТИДНОГО РЕЦЕПТОРА, СОЗДАНЫХ НА ОСНОВЕ БОМБЕЗИНА, ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. А. Горислав

*Пермский государственный университет*

✉ alisagorislav@gmail.com

### Аннотация

На сегодняшний день рак предстательной железы (РПЖ) — наиболее часто диагностируемое онкологическое заболевание и второй по распространенности вид рака среди мужчин. Основные методы диагностики РПЖ: определение уровня ПСА, ректальное исследование, мультипараметрическая магнитно-резонансная томография (МРТ) и биопсия предстательной железы (БПЖ) под контролем трансректального ультразвукового исследования (ТРУЗИ). Однако ни один из этих методов не является достаточно надежным, чтобы исключить наличие РПЖ наверняка. В связи с этим существует неудовлетворенная клиническая потребность в разработке и исследовании новых препаратов, которые можно использовать для диагностики и терапии РПЖ.

Одной из целевых мишеней РПЖ для этих целей может служить гастрин-релизинг пептидный рецептор (ГРПР) — рецептор, связанный с G-белком и состоящий из 384 аминокислот, эндогенным лигандом которого является пептид, высвобождающий гастрин. ГРПР избыточно экспрессируется в опухолевых клетках большинства видов РПЖ. Так, при первичном РПЖ сверхэкспрессия ГРПР наблюдается в 63–100 % случаев.

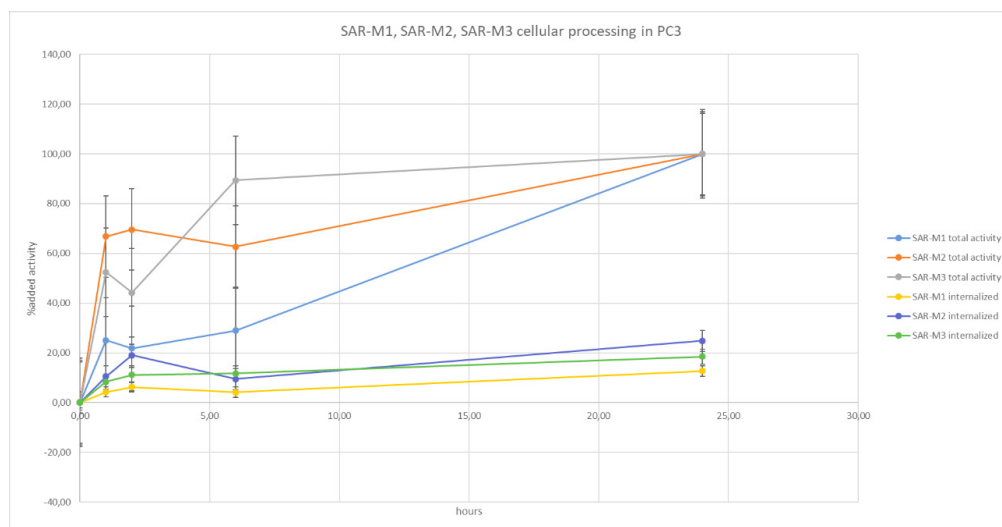
Бомбезин (БМ) — пептид из 14 аминокислот, первоначально извлеченный из кожи европейской огнебрюхой жабы. В последние десятилетия разработано множество синтетических аналогов бомбезина — агонистов и антагонистов ГРПР.

В настоящем исследовании проводится сравнение трех молекул, таргетированных на гастрин-релизинг пептидный рецептор (ГРПР) и являющихся его антагонистами и аналогами бомбезина:

- 1) SAR-M1: DOTAGA-Ama-Dig-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Sar-His-Leu-NHEt;
- 2) SAR-M2: DOTAGA-Arg-Ama-Dig-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Sar-His-Leu-NHEt;
- 3) SAR-M3: DOTAGA-DArg-Ama-Dig-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Sar-His-Leu-NHEt.

Для меченя индием-111 в реакционную смесь добавили 3 наноля пептида, 40 мкл буферного раствора  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,2 М) и 40 мкл  $^{111}\text{InCl}_3$  так, что на 1 наномоль пептида приходилось приблизительно 10 МБк активности. Затем смесь инкубировали при 85 °С 30 мин.

Для клеточного процессинга выбрали следующие временные точки: 1; 2; 6; 24 ч с момента добавления меченого соединения. За день до эксперимента на чашки Петри высаживали по 1 млн клеток линии РС3, экс-



Результаты клеточного процессинга для трех соединений

прессирующей ГРПР, и инкубировали при 37 °С сутки. На каждую временную точку брали по три чашки Петри. В день эксперимента в каждую чашку добавляли по 500 мкл свежей среды и 500 мкл раствора меченого соединения в концентрации 2 нМ. Клетки инкубировали при температуре 37 °С. На каждой временной точке проводились следующие операции: удаление супернатанта, промывание 500 мкл фосфатно-солевым буфером, добавление 600 мкл раствора кислотного промывания (0,2 М глицинового буфера, 0,15 М NaCl, 4 М мочевины, для отделения ассоциированных с мембраной и рецепторами молекул), инкубация на льду в течение 5 мин, сбор кислотного промывания и повторная обработка, добавление 600 мкл раствора основного промывания (1М NaOH, для отделения клеток от поверхности чашки и исследования интернализированной активности), инкубация при 37 °С до отделения клеток от поверхности чашки, сбор промывания и повторная обработка. Собранные образцы в дальнейшем отправляли на 2480 WIZARD Automatic Gamma Counter для подсчета СРМ. Результаты клеточного процессинга представлены на рисунке.

Видно, что SAR-M2 и SAR-M3 обладают схожим профилем связывания с таргетным рецептором на поверхности клетки и связываются с ним гораздо быстрее, чем SAR-M1. Однако все три соединения, как и большинство антагонистов ГРПР, слабо интернализуются внутрь опухолевых клеток.

## ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ КАНТАКСАНТИНА НА ДРОЖЖАХ *YARROWIA LIPOLYTICA*

В. А. Горчакова, Д. А. Дементьев, М. О. Таратынова, Е. Ю. Юзбашева

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

✉ nika.gorchak@yandex.ru

### Аннотация

Проведена генетическая инженерия штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica*, приводящая к получению продукции кантаксантина 7,8 мг/г сухого веса. Найдены оптимальные условия экстракции кантаксантина из лиофилизированной биомассы дрожжей.

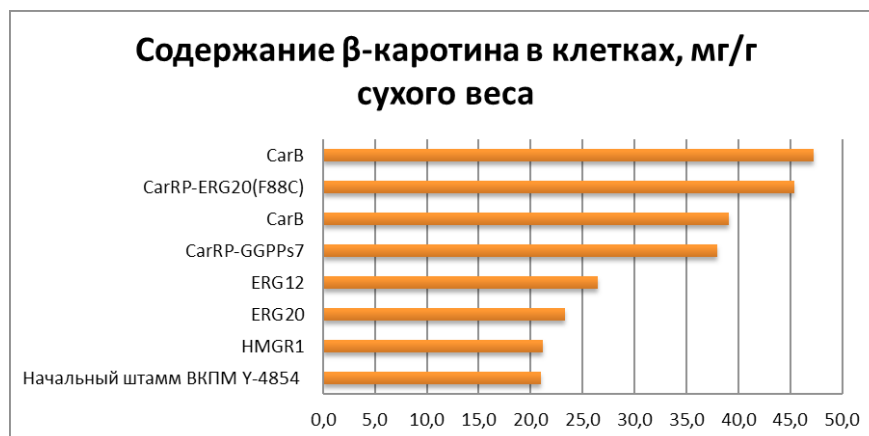
***Y. lipolytica*** — маслянистые непатогенные дрожжи, используемые для производства ряда веществ, в том числе каротиноидов. **Кантаксантин** — каротиноид, краситель с антиоксидантной активностью, который в ветеринарии применяется для увеличения срока хранения жидкой спермы за счет минимизации окислительного стресса [1], увеличения пигментации яичного желтка, массы яиц, улучшения выводимости, фертильности, иммуномодуляции и снижения смертности домашних птиц [2]. В медицине кантаксантин используется при снижении фоточувствительности и лечения болезни витилиго [3].

**Цель работы** — получение штамма дрожжей *Y. lipolytica* ВКПМ Y-5029, продуцирующего кантаксантин, с помощью генетической инженерии.

Для конструирования штамма-продуцента кантаксантина выполнена последовательная интеграция экспрессионных кассет в штамм линии W29 *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4854, характеризующегося накоплением  $\beta$ -каротина 21 мг/г сухого веса, с получением итогового штамма ВКПМ Y-5029:

- 1) ген *HMGR1*, кодирующий фермент 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу;
- 2) ген *ERG20*, кодирующий фермент фарнезилпирофосфатсинтазу;
- 3) ген *ERG12*, кодирующий фермент мевалонаткиназу;
- 4) слитые гены *CarRP-GGPPs7*, где *CarRP* *Mucor circinelloides* кодирует бифункциональный фермент фитоенсинтазу/ликопин  $\beta$ -циклазу, а *GGPPs7* *Synechococcus* sp. — геранилгеранилпирофосфат синтазу;
- 5) ген *CarB* *M. circinelloides*, кодирующий фермент фитоендегидрогеназу;
- 6) слитые гены *CarRP-ERG20(F88C)*, где *ERG20(F88C)* — мутантный вариант гена, кодирующий фермент фарнезилпирофосфат синтазу;
- 7) ген *CarB*;
- 8) ген *HpBKT* *Haematococcus pluvialis*, интегрированный для продукции кантаксантина и кодирующий фермент бета-каротин-кетоллазу.

Штаммы, продуцирующие  $\beta$ -каротин, культивировались в 10 мл в пробирках с общим объемом на 50 мл среды YP10/10Suc2 (10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л пептона, 20 г/л сахарозы с порционной подачей 2 % сахарозы на третьи сутки и 1 % на четвертые); штаммы, продуцирующие кантаксантин, культивировались в 50 мл



Этапы конструирования штамма дрожжей *Y. lipolytica*, продуцирующего предшественник кантаксантина —  $\beta$ -каротин



среды YP5/5Suc2 (5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л пептона, 20 г/л сахарозы с порционной подачей 1 % сахарозы на третьи сутки и 2 % на четвертые) в колбах на 750 мл при постоянном перемешивании при 28 °С и 275 об/мин сутки в течение пяти суток.

После культивирования биомассу промывали водой с 0,01 % ВНТ и лиофилизировали. Экстракция из лиофилизированной биомассы производилась на гомогенизаторе Precellys®24 (*Bertin Technologies*, Франция) при 5500 об/мин с помощью стеклянных шариков и этилацетата, этилацетата + 10 % этанола, хлороформа, хлороформа + 10 % этанола, ацетона.

### Результаты

Последовательное введение генов пути MVA и синтеза β-каротина повысило накопление последнего в клетке до 47,2 мг/г сухого веса (см. рисунок). Последующим введением всего одной копии гена *HpBKT* сконструирован штамм ВКПМ Y-5029, продуцирующий кантаксантин при культивировании в колбах в количестве 7,8 мг/г сухого веса. Наиболее полно экстракция из лиофилизированной биомассы проходила при использовании хлороформа.

### Литература

1. Bhalothia S. K., Mehta J. S., Kumar T. et al. Melatonin and canthaxanthin enhances sperm viability and protect ram spermatozoa from oxidative stress during liquid storage at 4 °C // *Andrologia*. 2022. Vol. 54. e14304.
2. Umar Faruk M., Roos F. F., Cisneros-Gonzalez F. A meta-analysis on the effect of canthaxanthin on egg production in brown egg layers // *Poultry Sci*. 2018. Vol. 97, is. 1. P. 84–87.
3. Gupta A. K., Haberman H. F., Pawlowski D. et al. Canthaxanthin // *Int. J. Dermatology*. 1985. Vol. 24. P. 528–532.

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ НЕПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *E. COLI M-17*

А. С. Губейко, В. М. Гречко, М. М. Воробьева

*Полесский государственный университет*

✉ asagubejko@gmail.com

### Аннотация

*E. coli M-17*, полученные из пробиотика «Биофлор», демонстрировали устойчивость к амоксицилину (ГРМ-бульон с 0,6 % феноловым красным, концентрация 25 мкг/мл), однако оказались чувствительными к амоклаву, цефтриаксону и цефепиму.

В настоящее время отмечается широкое распространение антибиотикорезистентных клеток бактерий *E. coli*, которые свидетельствует о серьезной угрозе снижения эффективности антибиотиков.

Резистентными к антибиотикам могут стать непатогенные клетки бактерий *E. coli*, которые, попадая из организма человека в окружающую среду, могут являться переносчиками генов резистентности. В случае снижения резистентности организма непатогенная кишечная палочка может становиться патогенным микроорганизмом, выходя за пределы своего биотопа, и вызывать аутоинфекционные интестинальные и экзоинтестинальные эшерихиозы [1, 2].

Распространение кишечных инфекций, вызываемых резистентными микроорганизмами, приводит к тому, что стандартные препараты, обычно используемые для лечения подобных инфекций, приходится заменять новыми и более дорогими лекарствами, что ведет к увеличению расходов на здравоохранение, повышению заболеваемости и смертности [3].

**Цель исследования** — определить чувствительность к бета-лактамам антибиотикам непатогенных *E. coli M-17*, полученных из пробиотика «Биофлор», с помощью теста Carba NP.

### Материал и методы

В качестве материала исследования выделили штаммы бактерий *E. coli M-17* из «Биофлора» по стандартной методике. Осуществляли идентификацию по определителю Берджи, основанную на морфологически-тинкториальных (окраска по Цилю — Нильсену и Граму), культуральных (использовали питательные среды: Кесслера, ГРМ-бульон, ГРМ-агар и Эндо) и биохимических (анализировали сахаролитические свойства, сульфитредуцирующую способность, каталазную активность, способность восстанавливать нитраты в нитриты) свойствах микроорганизмов.

В качестве методов исследования выбрали качественную реакцию на  $\beta$ -лактамы — гидроксамовая реакция и определение чувствительности (тест Carba NP на среде ГРМ-бульон с 0,6 % феноловым красным на выявление наличия бета-лактамаз у *E. coli M-17*).

### Результаты исследования

Амоксициллин, амоклав и цефтриаксон, используемые в рамках настоящего исследования, при гидроксамовой реакции имели осадок красного цвета, что свидетельствует о присутствии лактамного кольца и подтверждает принадлежность этих антибиотиков к бета-лактамам. Интересным представляется, что с цефепимом гидроксамовая реакция на  $\beta$ -лактаманное кольцо не прошла, хотя цефепим является бета-лактамом. На наш взгляд это обусловлено защитой бета-лактаманного кольца с помощью химической модификации. Кроме того, мы провели гидроксамовую реакцию на наличие лактамного кольца у азитромицина (азалид), в результате чего возник желтый осадок и у доксицилина (тетрациклин) с образованием коричневого осадка, что свидетельствует об отсутствии  $\beta$ -лактаманного кольца и непринадлежности данных антибиотиков к  $\beta$ -лактамам.

Бактерии, выделенные из пробиотика «Биофлор», идентифицировали по морфологически-тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам, в результате чего подтвердили их принадлежность к роду *E. coli*. На следующем этапе определили их чувствительность к бета-лактамам антибиотикам.

При проведении теста Carba NP на устойчивость *E. coli M-17* к амоксицилину (ГРМ-бульон с 0,6 % феноловым красным, концентрация 25 мкг/мл) наблюдали незначительное изменение окраски (что указывает на резистентность данного штамма к этому антибиотику); к амоклаву, цефтриаксону, цефепиму (ГРМ-бульон с 0,6 % феноловым красным, концентрация 25 мкг/мл) — сохранение окраски (что свидетельствует о чувствительности данного штамма к этим антибиотикам).

**Литература**

1. Резистентность к лекарственным средствам — проблема XXI века. URL: [http://www.mif-ua.com/archive/article\\_print/16222](http://www.mif-ua.com/archive/article_print/16222) (дата обращения: 23.03.2022).
2. Малый В. П. Эшерихиозы // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. 2011. № 5. С. 5–8.
3. Возрастающая угроза развития антимикробной резистентности. ВОЗ. URL: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44812/9789244503188\\_rus.pdf?sequence=16&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44812/9789244503188_rus.pdf?sequence=16&isAllowed=y) (дата обращения: 23.03.2022).

## РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ХИТОЗАНА И НАТУРАЛЬНОГО ШЕЛКА ПАУКА ДЛЯ НУЖД ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Д. И. Дауди<sup>1</sup>, Д. В. Маклаков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Белгородский государственный университет

✉ daud.99@mail.ru

### Аннотация

На сегодня более 6 млн людей ежегодно получают ожоговые травмы, 14 % приходится проводить трансплантацию кожи для лечения ожогов. Разработанный композитный материал из шелка пауков птицеядов и хитозана позволяет ускорить заживление поврежденных мягких тканей.

С развитием медицины появилось такое направление, как тканевая инженерия. В данном направлении используются принципы инженерных и биологических наук, применяемые для разработки биологических заменителей, которые восстанавливают, поддерживают или улучшают функцию тканей. Данное направление считается перспективным и быстро развивающимся в отрасли регенеративной медицины. Материалы для тканевой инженерии должны быть биосовместимыми и поддерживать адгезию, пролиферацию и дифференциацию клеток. Кроме того, в случае инженерии мягких тканей механические свойства должны соответствовать механической целостности ткани до тех пор, пока искусственный каркас не будет заменен естественным внеклеточным матриксом.

На сегодняшний день существуют различные материалы, позволяющие производить регенерацию поврежденных мягких тканей. Одним из таких материалов является шелк пауков. Цель нашего проекта — получить биосовместимый материал из полисахарида (хитозана) и шелка пауков птицеядов для ускоренной регенерации поврежденных тканей.

После сбора паутины у пауков *Psalmopoeus cambridgei* ее помещали в раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,02 М) и нагревали при температуре 70 °С в течение 90 мин. Высушенные волокна держали в водном растворе  $\text{HCl}$  (1 М) при 40 °С после ультразвуковой обработки в течение 4 ч с последующей сушкой при 60 °С в течение 12 ч. Далее полученную паутину растворяли в трифторуксусной кислоте и диализировали для образования раствора паутины. Раствор паутины пропускали через полупроницаемую мембрану с размером пор 50 кДа (ультрафильтрация) и отделяли получившийся белок.

Для создания пленок из хитозана его растворяли в 2%-м растворе уксусной кислоты, далее добавляли раствор паутины и отливали в формы, которые затем ставили в сушильный шкаф на 12 ч при температуре 60 °С для получения пленок из хитозана. На них после были высеваны мезенхимальные стволовые клетки крысы (табл. 1). Видно, что добавление выделенного белка паутины сильно ускоряет рост клеток на подложке по сравнению с чистым хитозаном.

Таблица 1

**Анализ роста мезенхимальных стволовых клеток крысы  
на приборе Thermo FS — Countess 3 FL Automated Cell Counter**

Культура — МСК крысы	0 дней	3 дня	7 дней
Хитозан	$0,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
Хитозан + белок (0,1 мг)	$0,5 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$2,89 \times 10^6$
Хитозан + белок (0,5 мг)	$0,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$

После подтверждения эффективности использования белка на подложке из хитозана решено провести испытания с мезенхимальными стволовыми клетками человека (табл. 2). Как можно увидеть, рост клеток человека на 7-й день был еще активнее, чем на чистой подложке из хитозана.

Таблица 2

**Анализ роста мезенхимальных стволовых клеток человека  
на приборе Thermo FS — Countess 3 FL Automated Cell Counter**

Культура — МСК человека	0 дней	3 дня	7 дней
Хитозан	$0,5 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$	$2,62 \times 10^6$
Хитозан + белок 0,1 мг	$0,5 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6$	$2,98 \times 10^6$
Хитозан + белок (0,5 мг)	$0,5 \times 10^6$	$2,47 \times 10^6$	$4,81 \times 10^6$

В настоящем исследовании доказано положительное влияние белка шелка пауков птицеядов на ускоренный рост клеток на подложках из хитозана.

**Литература**

1. Дауди Д. И. Создание флуоресцентных пен и пластырей на основе натурального шелка паука и углеродных наноструктур для медицинского применения: сб. тез. докл. Междунар. молодежной науч. конф. «Современные тенденции развития функциональных материалов». Сочи, 11–13 ноября 2021.
2. Sun W., Gregory D. A., Tomeh M. A., Zhao X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. P. 1499.
3. Schacht K., Vogt J., Scheibel T. Foams Made of Engineered Recombinant Spider Silk Proteins as 3D Scaffolds for Cell Growth // ACS Biomater. Sci. Eng. 2016. Vol. 2 (4). P. 517–525.

## ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ПЕТУНИИ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕОРГАНИЗАЦИИ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА *IN SITU* В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ\*

Д. В. Демиденко

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

✉ Frankenvini1998@mail.ru

### Аннотация

Данная работа посвящена получению трансгенных растений петунии с прижизненной визуализацией тубулинового цитоскелета методом агробактериальной трансформации для дальнейшего изучения реорганизации микротрубочек в условиях абиотического стресса.

Цитоскелет растительной клетки является высоко динамичным и универсальным внутриклеточным каркасом, построенным из микротрубочек и актиновых микрофиламентов [1]. Микротрубочки — элементы цитоскелета с внешним диаметром около 25 нм, состоящие из гетеродимеров, включающих глобулярные  $\alpha$ - и  $\beta$ -молекулы тубулина [2]. Ранние исследования показали, что кортикальные микротрубочки реорганизуются или деполимеризуются в ответ на абиотические стрессовые факторы, такие как холод [3], солевой стресс [4].

Гибридная петуния — одна из самых популярных цветочных культур. Семена петунии составляют около 30 % от всего производства семян в мире [5]. Как модельный объект, петуния легко выращивается и поддерживается в культуре клеток и тканей *in vitro*, что дает возможность проводить эксперименты с несколькими повторностями.

В данном исследовании проведена агробактериальная трансформация листовых эксплантов петунии (*Petunia hybrida* Vilm.) трех разных генотипов: петуния сорта Белый шар, самосовместимые и самонесовместимые клоны петунии. Генетическая конструкция содержала целевую последовательность MAP4-MBD, кодирующую репортерный белок mCherry для прижизненной детекции микротрубочек, а также селективный ген устойчивости к антибиотику *nptII*.

Агробактериальную трансформацию растений петунии проводили методом сокультивирования листовых эксплантов с разбавленной суспензией агробактерии. Индукция процессов морфогенеза совершена на питательной среде Мурасиге — Скуга (MS), дополненной 5 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИУК, 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 300 мг/л тиментина для элиминации агробактерии и 25 мг/л канамицина. Концентрацию канамицина на четвертом пассаже увеличили до 50 мг/л. Для стимуляции ризогенеза предположительно трансгенные побеги отделяли от каллуса и помещали в культуральные сосуды со средой MS с добавлением 1 мг/л ИМК и 50 мг/л канамицина.

По прошествии 4 месяцев на основании происхождения регенерантов получено 40, 54 и 26 независимых предположительно трансгенных линий петунии сорта Белый шар, самосовместимого и самонесовместимого клонов соответственно. Из них сформировали корни на среде для ризогенеза с высокой концентрацией канамицина (50 мг/л) 26, 16 и 2 линии. Эффективность селективного отбора, исходя из первоначального количества эксплантов, подвергнутых трансформации, на данный момент составила 7,7, 2,8 и 0,3 % соответственно.

В настоящее время отобрано 7 укорененных линий петунии сорта Белый шар. ПЦР-анализ подтвердил трансгенный статус только у 2 линий. Эффективность генетической трансформации петунии этого генотипа на данный момент составила 2,3 %. Для двух других генотипов продолжается селективный отбор и укоренение.

Для образцов с подтвержденной ПЦР-анализом вставкой селективного гена *nptII* проведен флуориметрический анализ корней, подтвердивший наличие экспрессии репортерного гена *mCherry*. Для получения более детализированного изображения тубулинового цитоскелета имеющиеся образцы будут исследованы методом конфокальной микроскопии.

### Литература

1. Staiger C. J. Signaling to the actin cytoskeleton implants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 51 (1). P. 257–288.
2. Janke C., Magiera M. M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. Vol. 21 (6). P. 307–326.
3. Bartolo M. E., Carter J. V. Microtubules in mesophyll cells of nonacclimated and cold-acclimated spinach: visualization and responses to freezing, low temperature, and dehydration // Plant Physiol. 1991. Vol. 97 (1). P. 175–181.
4. Shoji T., Suzuki K., Abe T. et al. Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in arabidopsis // Plant Cell Physiol. 2006. Vol. 47 (8). P. 1158–1168.
5. Козлова Е. А. Совершенствование технологий выращивания, размножения и оценка декоративных качеств линий петунии гибридной (*Petunia hybrida*, Vilm): дис. ... канд. с-х. наук: 06.01.08. М., 2016. 203 с.

\* Работа выполняется при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 22-24-01148).

## ВЛИЯНИЕ РАСТВОРА ТВС НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТУШЕК ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К *S. JEJUNI* ПРИ ВОДЯНОМ ОХЛАЖДЕНИИ

Д. С. Дерина, С. С. Козак

*Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности —  
филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (ВНИИПП)*

✉ [dasha.derina@mail.ru](mailto:dasha.derina@mail.ru); [vniipkozak@gmail.com](mailto:vniipkozak@gmail.com)

### Аннотация

Водяное охлаждение — одна из критических точек при производстве мяса птицы в плане перекрестной микробной контаминации поверхности тушек, в том числе и кампилобактериями. Применение для водяного охлаждения 0,1–0,2%-х растворов (по НУК) технологического вспомогательного средства в течение 20 мин снижает микробную обсемененность и профилактирует перекрестное обсеменение *S. jejuni* поверхности тушек птицы, не влияет на микробиологические, физико-химические и органолептические показатели мяса птицы.

Проблема кампилобактериоза в птицеперерабатывающей промышленности требует изучения и разработки способа профилактики заболеваний бактериального происхождения у людей при производстве мяса птицы [1].

Механизм выживания и последующей перекрестной контаминации кампилобактериями тушек домашней птицы малоизучен и требует проведения дополнительных исследований с целью снижения рисков возникновения пищевых заболеваний, связанных с употреблением мяса птицы, так как оно имеет большой удельный вес в структуре питания населения [2].

При выполнении работы использовали технологическое вспомогательное средство (ТВС) на основе надуксусной кислоты (НУК). Рабочие растворы дозировали по НУК. Для изучения антимикробных свойств ТВС на *S. jejuni* в лабораторных условиях смоделирована ванна охлаждения тушек из расчета 2 л охлаждающей среды на тушку. Установили, что применение для охлаждения 0,03–0,2%-х растворов ТВС позволяет инактивировать *S. jejuni* в охлаждающей среде после 20-минутной экспозиции. Использование для охлаждения 0,01%-х растворов при 20-минутной экспозиции снижает КМАФАнМ до 50 КОЕ/см<sup>3</sup>, а 0,03%-х растворов — до единичных колоний (табл. 1).

Таблица 1

**Исследование антимикробных свойств ТВС на микрофлору  
охлаждающей среды при охлаждении тушек (n = 12)**

Показатели, КОЕ/см <sup>3</sup>	Охлаждающая среда					
	Водопроводная вода	Концентрация ТВС, % (по НУК)				
		0,01	0,03	0,05	0,1	0,2
<i>S. jejuni</i>	(2,82 ± 0,13)·10 <sup>5</sup>	(1,21 ± 0,05)·10 <sup>5</sup>	Н/о	Н/о	Н/о	Н/о
КМАФАнМ	(1,71 ± 0,08)·10 <sup>4</sup>	50	< 10	< 10	< 10	< 10

Примечание. Н/о — не обнаружено. P ≤ 0,05.

В табл. 2 представлены результаты исследований ТВС на микрофлору поверхности тушек, контаминированных *S. jejuni*. Установили, что 0,01%-е растворы ТВС снижают КМАФАнМ с (4,6 ± 0,22)·10<sup>6</sup> до (1,3 ± 0,06)·10<sup>5</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>, содержание *S. jejuni* — с (2,7 ± 0,12)·10<sup>5</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> до (2,2 ± 0,01)·10<sup>5</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Растворы 0,03 и 0,05%-й концентрации уменьшают КМАФАнМ до единичных колоний в 1 см<sup>3</sup>, но не обеспечивают инактивацию *S. jejuni*, его содержание составило (1,8 ± 0,08)·10<sup>5</sup> и (1,6 ± 0,07)·10<sup>5</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> соответственно, 0,1–0,2%-е растворы ТВС снижают КМАФАнМ до единичных колоний и обеспечивают инактивацию *S. jejuni*.

Далее исследовали мясо цыплят-бройлеров по физико-химическим показателям: летучие жирные кислоты, перекисное число жира, кислотное число жира, реакция на аммиак и соли аммония с реактивом Несслера. Содержание летучих жирных кислот в тушках, охлажденных в 0,2%-м растворе ТВС, составило 2,44 ± 0,06 мг КОН/г, в тушках, охлажденных обычным способом (контроль), — 2,43 ± 0,05 мг КОН. Перекисное число жира в тушках, охлажденных в растворе ТВС, — 0,8 ± 0,2 (1/2 O<sub>2</sub>)/кг, а в контроле — 0,7 ± 0,2 (1/2 O<sub>2</sub>)/кг. Кислотное число жира в тушках, охлажденных в 0,2%-м растворе ТВС, составило

0,14 ± 0,04 мг КОН/г, а охлажденных обычным способом — 0,11 ± 0,03 мг КОН/г. Реакция с реактивом Несслера отрицательна.

Таблица 2

**Исследования антимикробных свойств ТВС на микрофлору поверхности тушек, контаминированных *S. jejuni* (n = 12)**

Показатели	Охлаждающая среда					
	Водопроводная вода	Концентрация ТВС, % (по НУК)				
		0,01	0,03	0,05	0,1	0,2
<i>S. jejuni</i> КОЕ/см <sup>3</sup>	(2,76 ± 0,12)·10 <sup>5</sup>	(2,27 ± 0,01)·10 <sup>5</sup>	(1,83 ± 0,08)·10 <sup>5</sup>	(1,62 ± 0,07)·10 <sup>5</sup>	-	-
КМАФАнМ, КОЕ/см <sup>3</sup>	(4,63 ± 0,22)·10 <sup>6</sup>	(1,35 ± 0,06)·10 <sup>5</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10

**Литература**

1. Булахов А. В., Шевелева С. А. Контроль патогенов в тушках цыплят-бройлеров с использованием современных методических подходов // Птица и птицепродукты. 2010. № 6. С. 45–49.
2. Шевелева С. А., Куваева И. Б. Микробиологическая безопасность пищи: развитие нормативной и методической базы // Вопросы питания. 2020. № 4, Т. 89. С. 125–145.



## ОКСИФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ КАК ИСТОЧНИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ\*

М. Е. Дмитриева, В. Н. Шелковникова, А. Ю. Бельшенко, Е. В. Малыгина, А. А. Власова, Д. В. Аксенов-Грибанов

*Иркутский государственный университет*

✉ marrie.dmitireva@gmail.com

### Аннотация

Выявление причин, способствующих нейродегенеративным процессам в головном мозге, является одной из наиболее важных задач современной медицины. В настоящее время существует несколько гипотез о механизмах, приводящих к повреждению и гибели клеток головного мозга при нейродегенеративных заболеваниях, таких как нарушение клеточного энергетического обмена и окислительный стресс, признающийся важнейшей причиной дегенеративных процессов [1].

Озеро Байкал представляет собой экосистему с низкой температурой воды и высоким содержанием растворенного кислорода. Предполагается, что в таких условиях обитают бактерии — оксифилы, сформировавшие защитные механизмы от окислительного стресса путем синтеза антиоксидантов, которые способны ингибировать активные формы кислорода. Таким образом, антиоксиданты, синтезируемые оксифильными бактериями озера Байкал, можно использовать для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Цель данного исследования — оценка антиоксидантной активности штаммов, выделенных в очагах с повышенным содержанием кислорода в озере Байкал.

Пробоотбор байкальской воды проведен в пос. Большое Голоустное и пос. Бугульдейка (Южный Байкал) из 4 зон с различными концентрациями кислорода: 9,97; 10,78; 11,91 и 12,19 мг/мл. Воду использовали для микробиологических посевов, направленных на селективное выделение оксифильных микроорганизмов, и оценки их антиоксидантной активности с применением метода DPPH. Анализ состава природных соединений проводили при помощи подходов хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и базы данных *Dictionary of natural Products* (DNP, CRC press, V.2018).

При селективном выделении оксифильных микроорганизмов отобрано 27 штаммов, из которых на данный момент антиоксидантную активность проявили 8. Идентифицировано 9 штаммов, из которых 4 относятся к роду *Flavobacterium* sp., 3 — к *Janthinobacterium* sp. и 2 — к *Pseudomonas* sp. В настоящее время ведется идентификация остальных микроорганизмов и оценка их антиоксидантной активности.

В ходе настоящего исследования был показан синтез таких антиоксидантов, как N-Acetyl-4-hydroxybenzylamine (масса 165,0788 Да, время удерживания 1,1 мин) и Arzanol (масса 402,1681 Да, время удерживания 3,7 мин). Штамм-продуцент в настоящее время проходит идентификацию. Соединение Arzanol, синтезируемое байкальским оксифильным штаммом, согласно литературным данным, ингибировало перекисное окисление липидов в модели окислительного стресса *in vivo*, а также избирательно снижало жизнеспособность линий раковых клеток, например мышечных клеток меланомы и клеток рака шейки матки человека [2].

### Литература

1. Niedzielska E. et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Mol. Neurobiology*. 2016. Vol. 53. P. 4094–4125.
2. Chang K. et al. Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases // *Clin. Chim. Acta*. 2018. Vol. 485. P. 79–87.

\* Работа проведена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственная регистрация 121111100025-5) и гранта Президента Российской Федерации (№ МК 1245.2021.1.4).  
© М. Е. Дмитриева, В. Н. Шелковникова, А. Ю. Бельшенко, Е. В. Малыгина, А. А. Власова, Д. В. Аксенов-Грибанов, 2022

**РН-МОДЕЛИРУЮЩАЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ ПОВЯЗКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ РАН**

М. А. Дмитриева, А. С. Панюта, К. И. Чимези, Ю. М. Пилипенко, Е. Ф. Кривошапкина

*Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург*

✉ [m\\_dmitrieva@scamt-itmo.ru](mailto:m_dmitrieva@scamt-itmo.ru)

**Аннотация**

Хронические раны характеризуются щелочным значением рН, в свою очередь, поддержание рН на уровне 6,5 в раневом ложе позволяет нейтрализовать токсичные бактериальные метаболиты (которые могут быть щелочными), влиять на активность и дифференцировку фибробластов. Следовательно, применение раневых повязок, модулирующих рН, может быть многообещающим вариантом лечения, способствующим заживлению хронических ран.

Разработаны гидрогелевые повязки на основе нанокристаллической целлюлозы, модифицированной аминокислотой гистидином, и желатином. Включение ионизируемых групп имидазола приводит к высокой буферной способности полученных гидрогелей. Данная композиция гидрогеля позволяет поддерживать рН моделируемой раневой жидкости на определенном уровне и предотвращать как защелачивание, так и закисление ран.

Буферная способность полученных гидрогелей изучена методом титриметрического анализа с растворами гидроксида натрия (NaOH) и соляной кислоты (HCl), а также с помощью анализа изменения рН симулированной раневой жидкости гидрогелями. Гидрогели продемонстрировали регулируемое рН-чувствительное высвобождение антибиотика гентамицина в слабокислом диапазоне рН. Кинетика высвобождения антибиотика изучена в модельных физиологических условиях. После этого его влияние на микроорганизмы в зависимости от концентрации гистидина и гентамицина в исходных гелях было оценено с помощью диск-диффузионного теста. Цитотоксичность исследована на клетках человеческих фибробластов с использованием резазуринового теста, который показал выживаемость более 75 % клеток.

**Литература**

1. Prince E. et al. Nanofibrillar Hydrogel Recapitulates Changes Occurring in the Fibrotic Extracellular Matrix // *Biomacromolecules*. 2021. № 6 (22). С. 2352–2362.
2. Wallace L. A., Gwynne L., Jenkins T. Challenges and opportunities of pH in chronic wounds // *Ther. Delivery*. 2019. Т. 10, № 11. С. 719–735.
3. Wang Y. et al. A novel pH-sensitive carrier for the delivery of antitumor drugs: Histidine-modified auricularia auricular polysaccharide nano-micelles // *Sci. Rep.* 2017. № 1 (7).

## ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТОВ L-АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* НА КУЛЬТУРАХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Н. В. Добрякова<sup>1</sup>, Д. Д. Жданов<sup>2</sup>, Е. В. Кудряшова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

<sup>2</sup>НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва

✉ natdobryak@gmail.com

### Аннотация

Синтезирован ряд конъюгатов L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* с сополимерами хитозан-ПЭГ, хитозан-гликоль, ПЭИ-ПЭГ и спермином и определена их противоопухолевая активность на линиях солидных клеток A549 и SkBr3 в сравнении с немодифицированным ферментом.

L-аспарагиназа (ЕС 3.5.1.1.) — жизненно важный фермент, который гидролизует L-аспарагин до L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Данный фермент используется в качестве лекарства в химиотерапии для лечения пациентов с острым лимфобластным лейкозом. Коммерческие препараты L-аспарагиназ получают в основном из *Escherichia coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (EwA). Однако высокий уровень гиперчувствительности и побочных реакций ограничивает их долгосрочное клиническое применение. Поэтому перспективным ферментом является L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum* (RrA), который имеет сниженную глутаминазную активность и почти в 2 раза более короткую аминокислотную последовательность по сравнению с EcA и EwA. Однако сниженная каталитическая активность при физиологических условиях (рН 7,0–7,5) и недостаточная стабильность в кровотоке могут снижать эффективность препарата. Для улучшения физико-химических параметров L-аспарагиназ можно использовать модификацию полиэлектролитами. В частности, в нашей лаборатории применяется ковалентная модификация ферментов сополимерами хитозана, полиэтиленгликоля (ПЭГ) и полиэтиленimina (ПЭИ) [1]. Предполагается, что данные сополимеры позволят регулировать свойства RrA, что способствует увеличению ее противоопухолевой активности и устойчивости к биодegradации.

Для определения противоопухолевых свойств L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* и ее модифицированных форм в работе синтезирован ряд конъюгатов с сополимерами хитозан-ПЭГ, хитозан-гликоль, ПЭИ-ПЭГ и спермином. Данные конъюгаты оказывали наилучшее влияние на фермент, повышая его каталитическую активность, термостабильность и устойчивость к трипсинолизу. Цитотоксическую активность полученных образцов измеряли на клеточных линиях аденокарциномы легкого (A549) и молочной железы (SkBr3). Для A549 наиболее заметный эффект снижения процента выживших клеток наблюдался для конъюгата RrA с хитозан-гликолем: выживаемость при концентрации препарата 10 МЕ/мл уменьшилась на 17 % по сравнению с немодифицированной L-аспарагиназой. Для конъюгатов с ПЭИ-ПЭГ и спермином небольшое снижение выживаемости выявлено при концентрациях 1–2,5 МЕ/мл (на 5–6 %). На клетках SkBr3 наибольшее снижение выживаемости наблюдалось для конъюгата RrA-ПЭИ-ПЭГ при концентрации 5 МЕ/мл (на 20 %). Данный эффект может быть обусловлен положительным дзета-потенциалом частиц конъюгата. Положительный заряд позволяет лучше связываться с поверхностью отрицательно заряженных опухолевых клеток и увеличивать цитотоксические свойства препарата.

### Литература

1. Dobryakova N. V., Zhdanov D. D., Sokolov N. N. et al. Improvement of Biocatalytic Properties and Cytotoxic Activity of L-Asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by Conjugation with Chitosan-Based Cationic Polyelectrolytes // Pharmaceut. Art. 2022. Vol. 15 (4). P. 406–425.

## УВЕЛИЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ\*

А. С. Доценко<sup>1</sup>, О. С. Савинова<sup>1</sup>, А. М. Рожкова<sup>1,2</sup>, И. Н. Зоров<sup>1,2</sup>, А. П. Сеницын<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

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

✉ a.dotsenko@fbras.ru

### Аннотация

Добавление гидролитических ферментов в корм сельскохозяйственных животных и птиц позволяет увеличивать скорость их роста за счет повышения усвояемости корма. Такие гидролитические ферменты, как ксиланазы и фитазы, добавляются в корм для гидролиза арабиноксиланов и фитатов в составе растительных клеток. Увеличение каталитической активности и термостабильности этих ферментов снизит дозировку ферментов и стоимость кормовых добавок.

Штаммы мицелиальных грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium* являются промышленными продуцентами гидролитических ферментов, в том числе ксиланаз и фитаз [1, 2]. Увеличение каталитической активности гидролитических ферментов в составе кормовых добавок позволяет использовать меньшие дозировки ферментов, что уменьшает стоимость добавок. Рост термостабильности также обеспечивает снижение дозировок и стоимости, так как корма и кормовые добавки проходят стадию гранулирования при повышенной температуре и ферменты после такой обработки должны сохранять высокую остаточную активность.

В данной работе осуществлен рациональный дизайн ксиланазы *E. P. canescens* и фитазы *A. A. niger* для увеличения каталитической активности и термостабильности.

Ксиланаза *E. P. canescens* катализирует гидролиз ксилан-содержащих субстратов, что способствует разрушению клеточных стенок растений. Ксиланаза *E. P. canescens* принадлежит к 10-й семье гликозид гидролаз и имеет характерный тип трехмерной структуры  $(\beta/\alpha)_8$ -бочки. Особенностью этого типа структуры, помимо того что цилиндр из 8  $\beta$ -листов окружен цилиндром из 8  $\alpha$ -спиралей, является близкое пространственное расположение N- и C-концов аминокислотной цепи. Аминокислотные замены в области N- и C-концов привели к повышению температуры плавления  $T_m$  на 1,1–3,1 °С по результатам дифференциальной сканирующей калориметрии. Каталитическая эффективность  $k_{cat}/K_m$  при этом увеличилась на 21 %, а удельная каталитическая активность — на 7–9 %.

Фитаза *A. A. niger* катализирует гидролиз фитатов, т. е. солей фитиновой, или мио-инозитгексафосфорной, кислоты, что повышает биодоступность фосфора, кальция, цинка и магния в составе кормов. Структура фитазы *A. A. niger* включает  $\alpha/\beta$ -домен и  $\alpha$ -домен, в области соприкосновения которых находится активный центр фермента. Осуществление аминокислотных замен в составе  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -листа привело к росту температуры плавления  $T_m$  на 0,9–2,0 °С по результатам дифференциальной сканирующей калориметрии. Каталитическая эффективность  $k_{cat}/K_m$  при этом увеличилась на 9–30 %, а удельная каталитическая активность — на 5–18 %.

### Литература

1. Gudynaite-Savitch L., White T.C. Fungal biotechnology for industrial enzyme production: focus on (hemi)cellulase production strategies, advances and challenges / Schmoll M., Dattenbock C. (eds) Gene expression systems in fungi: advancements and applications. Fungal Biology. Springer, 2016. P. 395–439.
2. Dhevagi P., Ramya A., Priyatharshini S. et al. Industrially important fungal enzymes: productions and applications // Yadav A. N. (ed.) Recent trends in mycological research, Fungal Biology. Springer, 2021. P. 263–309.

\* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (Соглашение № 075-15-2021-1071 от 28.09.2021).

## ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ РОДА *BACILLUS*

И. Ю. Евдокимов, А. Н. Иркитова, А. В. Малкова, М. В. Ширманов

Алтайский государственный университет, Барнаул

✉ ivan.evdokimov.92@mail.ru

### Аннотация

В данной работе произведен выбор оптимальной температуры глубинного культивирования и оценена возможность развития в разных температурных условиях новых природных штаммов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249, перспективных для включения в состав нового пробиотика для аквакультуры и животных.

В процессе выращивания различных микроорганизмов большое значение имеет создание наиболее благоприятных условий для развития и размножения культур. Кроме приемов по оптимизации состава питательных сред, не менее важным является подбор оптимальных физических параметров культивирования [1]: температурный режим, степень аэрации, уровень рН и т. д. В данной работе проанализирован один из этих параметров — температурный режим при глубинном культивировании.

Для биосинтеза каждого живого организма, в том числе споровых бактерий, требуется определенная температура [2], статирование которой влияет на накопление биомассы и достижение максимального количества КОЕ. При определении оптимальной температуры возможно изучить потенциально неблагоприятные условия, представляющие дополнительную информацию о возможности развития бактерий в природных, некомфортных условиях.

Объектами исследования явились штаммы *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ. Для определения оптимальной температуры культивирования штаммов *Bacillus* использовался шейкер-инкубатор «Innova 44» при заданных условиях: 15; 25; 30; 37; 42 °С — исследуемая температура, скорость перемешивания — 250 об/мин, время выращивания — 24 ч. Культивирование проводилось в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, с заполнением 200 мл.

Результаты исследований температурного режима *B. pumilus* представлены в табл. 1.

Таблица 1

### Характеристика культуры *B. pumilus* после 24 ч культивирования

Температурный режим, °С	Параметры культуры		
	Показатель рН	Оптическая плотность (ОП <sub>490</sub> )	Количество КОЕ/мл
Посевной материал	6,85(± 0,01)	0,378(± 0,001)	2,0(± 0,9) × 10 <sup>9</sup>
15	6,64(± 0,09)	0,089(± 0,026)	3,4(± 1,4) × 10 <sup>8</sup>
25	6,79(± 0,18)	0,429(± 0,057)	2,4(± 0,6) × 10 <sup>9</sup>
30	6,76(± 0,18)	0,482(± 0,098)	2,3(± 0,8) × 10 <sup>9</sup>
37	6,95(± 0,21)	0,574(± 0,117)	4,6(± 0,9) × 10 <sup>9</sup>
42	7,12(± 0,23)	0,311(± 0,045)	1,0(± 0,3) × 10 <sup>9</sup>

Полученные данные указывают, что максимальный титр КОЕ/мл достигается при температуре 37 °С — 4,6(± 0,9) × 10<sup>9</sup>, что подтверждается оптической плотностью — 0,574(± 0,117). Наименьшие показатели наблюдаются при 15 и 42 °С (КОЕ/мл: 3,4(± 1,4) × 10<sup>8</sup>, 1,0(± 0,3) × 10<sup>9</sup>; ОП: 0,089(± 0,026), 0,311(± 0,045)). Подмечено, что *B. pumilus* при температуре 15 и 42 °С растет, набирает количество КОЕ/мл при всех заданных температурных режимах.

Аналогичным образом получены результаты исследований температурного режима глубинного культивирования *B. toyonensis* (табл. 2).

Наибольший титр КОЕ/мл, как и в исследованиях предыдущей культуры, достигается при температуре 37 °С — 4,3(± 0,9) × 10<sup>9</sup>, при оптической плотности 0,995(± 0,102). Наименьшие показатели при 15 и 42 °С (КОЕ/мл: 1,0(± 0,4) × 10<sup>8</sup>, 3,9(± 0,9) × 10<sup>7</sup>; ОП: 0,513(± 0,042), 0,370(± 0,139)). 15 °С — минимальный порог развития *B. toyonensis*, что обусловлено низкой скоростью внутриклеточных процессов и, соответственно, сниженной скоростью размножения. При температуре в 42 °С часть клеток претерпевает структурные изменения и гибнет.

Таблица 2

Характеристика культуры *V. toyoensis* после 24 ч культивирования

Температурный режим, °С	Параметры культуры		
	Показатель рН	Оптическая плотность (ОП <sub>490</sub> )	Количество КОЕ/мл
Посевной материал	6,85(± 0,01)	0,568(± 0,002)	3,0(± 1,1) × 10 <sup>8</sup>
15	6,20(± 0,04)	0,513(± 0,042)	1,0(± 0,4) × 10 <sup>8</sup>
25	6,72(± 0,01)	0,533(± 0,121)	4,6(± 0,6) × 10 <sup>8</sup>
30	7,00(± 0,24)	0,858(± 0,022)	4,7(± 0,6) × 10 <sup>8</sup>
37	6,76(± 0,24)	0,995(± 0,102)	4,3(± 0,9) × 10 <sup>9</sup>
42	6,60(± 0,31)	0,370(± 0,139)	3,9(± 0,9) × 10 <sup>7</sup>

Таким образом, оба исследованных штамма перспективны для включения в состав пробиотика для аквакультур. При этом возможность развития выбранных культур в большом диапазоне температур (15–42 °С) позволяет более широко применять пробиотик на различных объектах (артемии, креветки, рыбы и т. д.) при разных условиях их воспроизводства.

**Литература**

1. Макушин А. Н., Зипаев Д. В., Кожухов А. Н. Влияние температуры и аэрации на рост пивоваренных дрожжей // Пищевая промышленность. 2021. Т. 2. С. 44–48.
2. Колодязная В. А., Самотруева М. А. Биотехнология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. С. 384.

## СПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ *PANTOEA BRENNERI* К МОБИЛИЗАЦИИ ШИРОКОГО СПЕКТРА НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТОВ\*

Е. А. Егорова, А. Д. Сулейманова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ egorova.evgenia@mail.ru

### Аннотация

Актуальной проблемой сельского хозяйства становится чрезмерное внесение фосфорных удобрений, которое пагубно влияет на экологическое состояние почвы. Штамм *P. brenneri* 3.5.2, обладающий уникальной способностью к мобилизации фосфора как из органических фитатов, так и из широкого спектра неорганических фосфатов, имеет перспективы для использования в качестве биоудобрения с целью улучшения фосфорного питания растений. Наиболее благоприятными условиями для мобилизации фосфатов из трикальцийфосфата штаммом *P. brenneri* являются исходный pH среды 7,0, температура культивирования в диапазоне от 30 до 42 °C и скорость качания 200 об/мин.

В почве фосфор содержится в органической и неорганической форме, большая часть которого представлена первичными труднорастворимыми минералами в виде апатитов, фосфоритов, фторофосфатов, ортофосфатов и др. Такие формы фосфора недоступны для растений. Современное сельское хозяйство проявляет большой интерес к применению бактериальных удобрений на основе фосфатсолюбилизирующих бактерий (PSB) для сокращения внесения минеральных удобрений.

Внесение PSB в почву способствует увеличению доступного фосфора для растений, снижает pH почвы и формирует вокруг ризосферы область, содержащую в себе свободные фосфаты, тем самым благоприятно воздействуя на рост растений.

Ранее было установлено, что выделенные из почвы Республики Татарстан изоляты *Pantoea brenneri* способны гидролизовать органическое труднорастворимое соединение почвенного фосфора — фитат. Представляло интерес изучить способности штаммов *P. brenneri* к мобилизации широкого спектра неорганических почвенных фосфатов.

Способность к мобилизации почвенных фосфатов исследовали у нескольких штаммов: *P. brenneri* 3.1, *P. brenneri* 3.2, *P. brenneri* 3.5.2, *P. brenneri* 3.6.1. Анализ проводили на твердой питательной среде NBRIP, содержащей один из труднорастворимых фосфатов в качестве единственного источника фосфора. Все исследуемые штаммы были способны расти и образовывать гало-зоны на средах, содержащих трикальцийфосфат, гидроортофосфат кальция, гидроксиапатит и фосфорит, однако на средах с фосфатом алюминия и фосфатом железа зон просветления не наблюдали. Количественное исследование мобилизации фосфатов штаммами *P. brenneri* показало, что максимальную эффективность P-солюбилизации проявлял штамм *P. brenneri* 3.5.2 на среде с  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  — 68,74 %, количество выделенных фосфатов — 1341,66 мг/л. В процессе культивирования бактерии снижали pH среды почти вдвое.

Также представляло интерес изучить влияние факторов культивирования, таких как pH среды, температура и скорость качания, на способность штамма *P. brenneri* 3.5.2 к мобилизации фосфатов.

Влияние исходного pH среды изучали в диапазоне 2–9. Установлено, что исходный pH среды 7,0 оказывал стимулирующее действие на мобилизацию фосфатов из  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ : эффективность солюбилизации составила 44 %, при этих условиях также происходило максимальное подкисление среды: pH снижался с 7,0 до 2,9.

Влияние температуры культивирования на способность штамма к мобилизации фосфатов изучали в диапазоне 25–42 °C. Эффективность солюбилизации при изучаемых температурах выше 30 °C была в пределах 42–46 %. Таким образом, в диапазоне 30–42 °C не выявлено зависимости мобилизации фосфатов из  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  штаммом *P. brenneri* от температуры культивирования.

На следующем этапе изучали влияние скорости качания в диапазоне от 100 до 230 об/мин. Скорость качания, равная 200 об/мин, оказывала стимулирующее действие на мобилизацию фосфатов из  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  штаммом *P. brenneri* 3.5.2.: эффективность солюбилизации составила 42,23 %, pH среды при этом снижался до 3.

\* Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансирована грантом Российского научного фонда (№ 21-76-00017).

© Е. А. Егорова, А. Д. Сулейманова, 2022

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ АДЬЮВАНТОВ НА ОСНОВЕ БЕТА-ГЛЮКАНОВ ДРОЖЖЕЙ

Т. И. Есина, Е. А. Волосникова, Д. Н. Щербаков, Е. Д. Даниленко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ ti\_esina@mail.ru

### Аннотация

Разработан метод получения  $\beta$ -глюканов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Проведено исследование адьювантной активности препарата  $\beta$ -глюканов при иммунизации мышей рецепторсвязывающим доменом S-белка вируса SARS-CoV-2. Методом иммуноферментного анализа продемонстрировано более выраженное усиление гуморального иммунного ответа на антиген под действием  $\beta$ -глюканов, чем в случае использования гидроокиси алюминия.

Одним из способов улучшения иммуностимулирующих свойств современных вакцин является применение адьювантов. Необходимость включения в состав вакцин веществ с адьювантной активностью обусловлена рядом причин. Прежде всего, это связано с невысокой иммуногенностью многих современных вакцин и их неспособностью стимулировать иммунный ответ слизистых, а также с необходимостью повышения иммуногенности вакцины при однократной вакцинации [1].

В последние десятилетия значительно возрос интерес к использованию в фармацевтической практике полисахаридов, таких как  $\alpha$ -глюканы (модифицированный декстран),  $\beta$ -глюканы (дрожжевые полисахариды и лентинан),  $\beta$ -фруктаны (инулин), маннан и хитозан, которые рассматриваются как потенциальные иммуноадьюванты [2]. Бета-глюканы являются составляющими клеточной стенки ряда патогенных бактерий (*Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*) и дрожжевых грибов (*Saccharomyces cerevisiae*).

В данной работе разработана методика и получены образцы  $\beta$ -глюканов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-448. Для очистки  $\beta$ -глюканов использовали клеточный дебрис, образовавшийся при выделении двуспиральной РНК на этапе разрушения биомассы. Дебрис растворяли в 1%-м растворе SDS (додецилсульфат натрия) и 0,4 М хлорида натрия. В качестве ферментного комплекса для очистки от балластных белков применяли «Протосубтилин г3х» (производство ПО «СИББИОФАРМ» г. Бердск), обладающий протеазной активностью по отношению к белкам клеточной стенки [3], в количестве 5 мг комплекса на 10 г клеточного дебриса. Ферментативный гидролиз вели при 50 °С в течение 6 ч. После этого полупродукт подвергался шестикратной отмывке раствором 1%-го SDS и трехкратной промывке деионизованной водой с последующим центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин, 30 °С). Полученный осадок  $\beta$ -глюканов растворяли в деионизованной воде (30 °С) и подвергали воздействию ультразвука (частота 24 кГц/с в течение 15 мин, циклами по 5 мин с интервалом в 2 мин для охлаждения). Разрушение вели во льду. Образовавшуюся суспензию титровали 1 М гидроксидом натрия до значения pH 10,0 и инкубировали в термостате 45 мин при 60 °С. Полученный полупродукт центрифугировали (10 000 об/мин, 20 мин), и далее осадок отмывали 10 раз деионизованной водой с последующим центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин). Конечный осадок растворяли в деионизованной воде и сушили 12 ч при 50 °С. В результате данного процесса образуется до 800 мг препарата  $\beta$ -глюканов из 5 г клеточного дебриса. Содержание основного вещества в таком препарате составляет 80–88 %.

Оценку адьювантной активности полученного препарата проводили на лабораторных мышах при иммунизации рекомбинантным рецепторсвязывающим доменом (RBD) S-белка SARS-CoV-2, дельта-штамма (B.1.617.2). Показано, что двукратная, с интервалом в три недели, иммунизация RBD (50 мкг на мышь) в комплексе с препаратом  $\beta$ -глюканов (1 мг на мышь) обеспечивала индукцию специфических антител. Средний титр сывороточных антител, определенных ИФА, у мышей экспериментальной группы в 2,5 раза превышал титр мышей, иммунизированных той же дозой RBD в комплексе с гидроокисью алюминия, что на два порядка выше по сравнению с группой, иммунизированной RBD без адьюванта.

### Литература

1. Criscuolo E., Caputo V., Diotti R. A. et al. Alternative Methods of Vaccine Delivery: An Overview of Edible and Intradermal Vaccines // J. Immunol. Res. 2019. Т. 2019.
2. Fesel P. H., Zuccaro A. Beta-glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants // Fungal Genet. Biol. 2016. Vol. 90. P. 53–60.
3. Пат. 2504384 Российская Федерация. Способ получения водорастворимых фракций маннопротеинов и  $\beta$ -глюкана / Бычков А. Л., Ломовский О. И.; опубл. 20.01.2014. Бюл. № 2.



## КОЛЛЕКЦИЯ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ ПОРОД В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ФНЦ АГРОЭКОЛОГИИ РАН

О.О. Жолобова

Федеральный научный центр агроэкологии,  
комплексных мелиораций и защитного лесоразведения РАН, Волгоград

✉ zholobova-o@vfanc.ru

### Аннотация

Коллекция *in vitro* хозяйственно ценных деревьев и кустарников, перспективных в защитном лесоразведении, является источником селекционно важных признаков, обширной базой для научно-исследовательской работы и используется в качестве обогащения агроландшафтов.

В последние десятилетия во многих странах возрос интерес к биотехнологическим коллекциям растительных объектов. Основная цель таких коллекций заключается в надежном сохранении генофонда растительных ресурсов, прежде всего редких и исчезающих видов растений, а также ценных генотипов, полученных благодаря селекционной работе профильных учреждений. В практике создания, поддержания и использования биотехнологических коллекций существуют следующие основные направления: сохранение генетических ресурсов в пересадочных коллекциях (растения *in vitro*, культуры органов и клеток), депонирование растительных объектов при пониженных температурах и хранение растительных объектов в криобанках [1].

В 2019 г. на базе ФНЦ агроэкологии РАН создана лаборатория биотехнологий, основной задачей которой являлась разработка элементов эффективной системы микроклонального размножения древесно-кустарниковых видов растений, перспективных в защитном лесоразведении, для изучения адаптивных механизмов растений-регенерантов и осуществления селекционных программ в культуре *in vitro*.

Выбор оптимальной модели культивирования *in vitro* и особенностей клонального микроразмножения отдельных таксономических групп растений тесно связаны с их биологическими особенностями онтогенеза [2]. Изучение физиологических процессов их развития в природе и коллекциях служит основой для разработки биотехнологических приемов культивирования для дальнейшего устойчивого воспроизводства и возможности осуществления селекционных программ в лабораторных условиях.

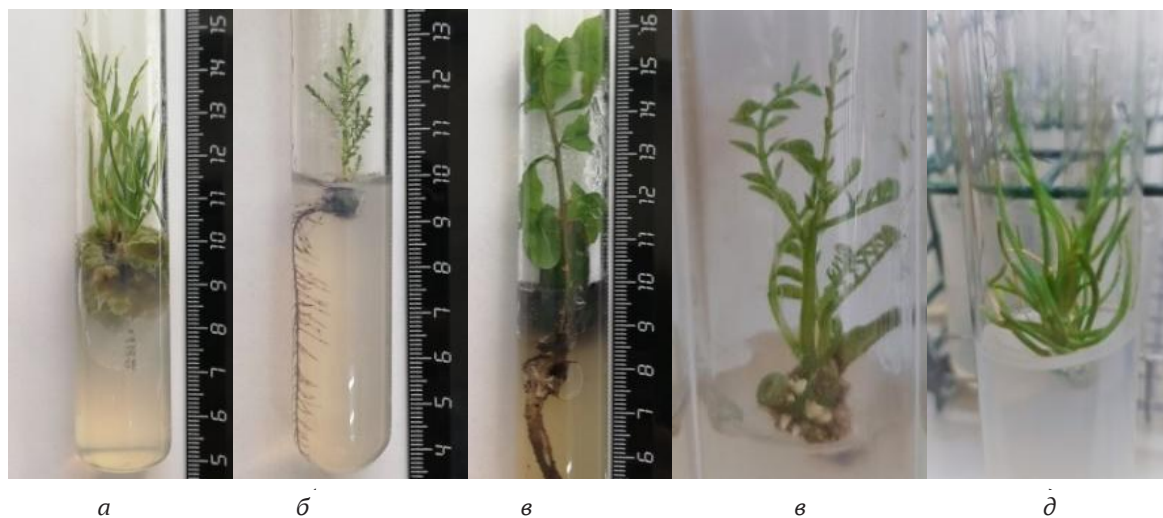
При формировании коллекции ФНЦ агроэкологии РАН хозяйственно ценных деревьев и кустарников в культуре *in vitro* главными критериями в выборе объектов являлись:

1) ценные генотипы — селекционные достижения самого института и отобранные в природе формы, некоторые из которых сохранились в единичных экземплярах, с целью сохранения генетических ресурсов и их стабильного воспроизводства;

2) модельные объекты для селективных систем *in vitro* — сложность работы с древесно-кустарниковыми видами, которая заключается в их больших размерах, продолжительности жизненного цикла, наследственно закрепленной ритмичности и периодичности физиологических процессов, обуславливает некоторые проблемы в получении активно пролиферирующей культуры тканей, способной к морфогенезу. В настоящий момент методики микроклонального размножения и селективного отбора *in vitro* разработаны на ограниченном числе древесных видов, что говорит о необходимости более глубокого и детального изучения других видов в лабораторных условиях.

В качестве первичных эксплантов при формировании коллекции использовали семенной и растительный материал, привезенный из экспедиций и взятый с интродукционных участков ФНЦ агроэкологии РАН. Качество работ на первом этапе введения в культуру *in vitro* зависит не только от подбора режима стерилизации и соблюдения правил асептики: большое значение имеет состояние растения-донора, особенно древесных видов. Возраст, фенологическое состояние и наличие эндогенной инфекции сильно усложняют получение стерильных эксплантов. Учитывая, что многие образцы находились в единичных экземплярах и альтернативных доноров не было, не у всех отобранных видов удалось получить регенеранты в культуре *in vitro*.

На сегодняшний день коллекция древесно-кустарниковых видов в культуре *in vitro* включает 21 вид, относящийся к 13 семействам: *Fabaceae* Lindl. — 24 % (5 представителей); *Rosaceae* Juss. — 14 % (3 вида); *Salicaceae* Mirb. — 9 % (2 вида); *Fagaceae* Dumort. — 9 % (2 вида), остальные семейства представлены в коллекции менее 5 % и насчитывают только по одному образцу (см. рисунок).



Коллекция *in vitro* ценных генотипов древесно-кустарниковых растений: а — *Calligonum aphyllum*; б — *Tamarix* 'Mayskii sneg'; в — *Quercus macrocarpa*; з — *Robinia pseudoacacia* 'Cometa'; д — *Pinus nigra*

Репрезентативность коллекции позволяет отбирать наиболее пластичные и удобные модельные объекты для проведения фундаментальных научных исследований в культуре *in vitro*. Разработка элементов методики микрклонального размножения модельных объектов поможет не только решить проблемы сохранения биоразнообразия, но и при необходимости получать достаточное количество материала для создания искусственных популяций и выполнения работ по интродукции и селекции лесомелиоративных, декоративных, плодовых и лекарственных видов растений.

#### Литература

1. Растительная биотехнология — способ рационального использования биосинтетического потенциала / В. Решетников, Е. Спиридович, Т. Фоменко, А. Носов // Наука и инновации. 2014. № 5 (135). С. 21–25.
2. Молканова О. И., Коновалова Л. Н., Стахеева Т. С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень Гос. Никит. ботанического сада. 2016. № 120. С. 17–23.

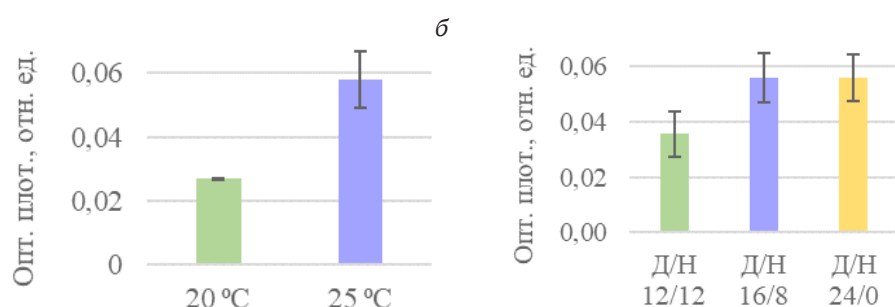
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *P. LUNULA*Р. И. Загитова<sup>1</sup>, М. А. Синетова<sup>2</sup>, И. В. Ямпольский<sup>1</sup>, З. М. Осипова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва<sup>2</sup>Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

✉ zagitova.ri@phystech.edu

**Аннотация**

В рамках проекта по исследованию биосинтеза люциферина динофлагеллят *P. lunula* проведена оптимизация условий культивирования биомассы: изучено влияние различных параметров на рост культуры — соотношения длительности циклов «день — ночь», температуры в среде питательных веществ на рост динофлагеллят *P. lunula*.

Динофлагелляты — группа морских протистов, объединяющая ~ 2400 видов, часть из которых обладает способностью светиться, или биолюминесцировать (см. рисунок, а). Механизм биолюминесценции динофлагеллят подробно изучен, однако некоторые его аспекты, в частности путь биосинтеза люциферина, остаются неизвестными до сих пор [1]. В рамках проекта по установлению пути биосинтеза люциферина динофлагеллят *P. lunula* была поставлена задача наработки большого количества биомассы с целью выделения необходимых для дальнейшей работы низкомолекулярных компонентов, в том числе люциферина. Нарботка биомассы динофитовых водорослей является нетривиальной задачей ввиду низкой скорости их роста и особенностей метаболизма, не позволяющих достичь высокой плотности культуры [2], и требует оптимизации условий культивирования для каждого конкретного вида.



Оптимизация условия культивирования динофлагеллят *P. lunula*: свечение *P. lunula* в темноте (а); влияние температуры (б) и различных циклов «день — ночь» (в) на рост культуры

Для культивирования выбраны автотрофные динофлагелляты *P. lunula*, поскольку виды *Pyrocystis* люминесцируют гораздо активнее других видов и содержат относительно высокие концентрации люциферина. Оптимизацию проводили по следующим параметрам: температура, соотношение длительности циклов «день — ночь» и различное содержание нитрата и фосфата в среде. Установлено, что культивирование при температуре 25 °C (по сравнению с 20 °C) позволяет добиться увеличения роста биомассы в 2 раза (см. рисунок, б); изменение длительности светового цикла в сторону 16/8 и 24/0 (по сравнению с классическим соотношением 12/12) — в 1,5 раза (см. рисунок, в), а дополнительное добавление после продолжительного культивирования питательных веществ (нитрата и фосфата) не оказывает влияния. Также не было обнаружено различия при культивировании на средах, стерилизованных автоклавированием или фильтрацией. Применение автоклавирования значительно снижает стоимость и трудоемкость подготовки среды.

**Литература**

1. Fajardo C. et al. New perspectives related to the bioluminescent system in dinoflagellates: *Pyrocystis lunula*, a case study // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. P. 1–22.
2. Rodriguez J. J. G. et al. Culture of dinoflagellates in a fed-batch and continuous stirred-tank photobioreactors: Growth, oxidative stress and toxin production // Process Biochem. 2010. Vol. 45. P. 660–666.

## ХАРАКТЕРИСТИКА НЕПРЕРЫВНОГО ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ИМИГЛЮЦЕРАЗЫ В РАМКАХ КОНЦЕПЦИИ *QUALITY BY DESIGN* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК СНО

З. В. Захаров, А. Н. Морозов, И. Р. Яхин

АО «Генериум», пос. Вольгинский

✉ zakharov@ibcgenerium.ru

### Аннотация

Впервые осуществлена характеристика перфузионного процесса культивирования клеток-продуцентов при производстве терапевтического моноклонального препарата имиглюцеразы в рамках концепции «Качество через разработку» (*Quality by design*).

Имиглюцераза — фермент, предназначенный для заместительной терапии пациентов с болезнью Гоше I типа [1]. В нашей лаборатории разработан процесс культивирования клеток-продуцентов имиглюцеразы в режиме перфузии. При таком способе выращивания клеток происходит непрерывная подача свежей питательной среды и отток отработанной культуральной жидкости (перфузат), а клетки удерживаются в биореакторе [2]. В перфузии, в отличие от периодического способа культивирования, удается сохранить высокую биологическую активность лабильного целевого белка. Это происходит в первую очередь за счет малого времени пребывания продукта в биореакторе [3].

С целью более глубокого понимания взаимосвязи между условиями ведения промышленного процесса, его производительностью и показателями качества продукта инициирована работа по характеристике перфузионного процесса получения имиглюцеразы в рамках концепции «Качество через разработку» (*Quality by design*) [4, 5].

На начальном этапе идентифицированы критические показатели качества (CQA) имиглюцеразы и ключевые показатели процесса (KPA). На основе «Анализа причин и последствий отказов» (FMEA) проведена оценка рисков для всех этапов культивирования и выявлены: один *потенциальный ключевой* параметр процесса (pKPP) — длительность культивирования; несколько *потенциальных критических* параметров процесса (pCPP) — расчетная концентрация дитиотреитола (ДТТ), подаваемого в культуральную жидкость (КЖ) для предотвращения окисления целевого белка, условия хранения раствора ДТТ: температура и длительность хранения, концентрация раствора, доля воздуха в емкости с раствором.

С помощью квалифицированной демасштабированной модели промышленного биореактора на базе лабораторной установки Biostat В 5L изучено влияние расчетной концентрации ДТТ в КЖ на характеристики процесса. Показано, что при 0,5 мМ ДТТ титр белка в перфузате снижается на  $15 \pm 7$  %, а при 2 мМ ДТТ результаты статистически не отличаются от контроля (1 мМ ДТТ). При увеличении концентрации ДТТ в стационарной фазе до 5 мМ наблюдается постепенный некроз клеток, снижение экспрессии целевого белка. Однако оказалось, что эти изменения обратимы после прекращения негативного воздействия повышенной концентрацией ДТТ.

Для исследования условий хранения водных растворов ДТТ концентрации от 10 до 1000 мМ применяли факторно-планируемый композиционный план. Показана высокая стабильность растворов в течение 7 суток во время хранения при температуре  $5 \pm 3$  °С и наличии воздуха над поверхностью раствора (10 % объема емкости). Замечено, что в худших условиях хранения (21 день, температура +37 °С, 10-кратное содержание воздуха относительно количества раствора) ДТТ не окисляется полностью: остаточное количество неокисленного ДТТ составило 47 и 68 % для растворов ДТТ 10 и 1000 мМ соответственно.

В результате работы показано, что для перфузионного культивирования имиглюцеразы при разработанной стратегии контроля отсутствуют CPP, а KPP являются только два параметра: расчетная концентрация ДТТ в КЖ и длительность культивирования. Для KPP и других параметров, связанных с условиями хранения раствора ДТТ, расширены границы рабочих диапазонов и определены допустимые границы варьирования. Установлено, что рабочие диапазоны приемлемы и устойчивы, параметры хорошо контролируемы, а перфузионный процесс культивирования клеток-продуцентов имиглюцеразы в целом надежен.

### Литература

1. Давыдкин И. Л., Хайретдинов, Р. К., Кривова, С. П., Данилова, О. Е. Болезнь Гоше: клиническая картина, диагностика, лечение // Эффективная фармакотерапия. 2014. № 47. С. 22–27.
2. Bielser J. M., Wolf M., Souquet J. et al. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing — A critical review // Biotechnol. Adv. 2018. Vol. 36 (4). P. 1328–1340.

- 
3. Wong H. E., Chen C., Le H. et al. From chemostats to high-density perfusion: the progression of continuous mammalian cell cultivation // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2021.
  4. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical development Q8 (R2). 2009.
  5. Hakemeyer C., McKnight N., John R. S. et al. Process characterization and design space definition // Biologicals. 2016. Vol. 44 (5). P. 306–318.

## ПОДБОР КОМБИНАЦИЙ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭФФЕКТИВНУЮ ЗАЩИТУ ПРОТИВ БОТУЛОТОКСИНА ТИПА А, МЕТОДОМ МЫШИНОЙ БИОПРОБЫ\*

Н. А. Зенинская, М. А. Марьин, А. К. Рябко, А. С. Карцева, М. В. Силкина,  
Т. И. Комбарова, Я. О. Романенко, М. М. Рогозин, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, р. п. Оболенск

✉ nataliazenskaya@mail.ru

### Аннотация

Ботулизм является тяжелым невропаралитическим заболеванием, чаще всего в форме пищевой интоксикации. Ботулотоксин — один из сильнейших природных ядов, поэтому быстрдействие и эффективность разрабатываемых средств терапии должно всегда быть в приоритете в прикладных исследованиях подобной тематики.

Цель данной работы — оценить способность полученных мышинных моноклональных антител (МКА) к нейтрализации ботулинического токсина типа А *in vivo* и отобрать наиболее выгодные их комбинации.

### Материалы и методы

Несколько пулов мышинных гибридов-продуцентов МКА к рекомбинантным белкам легкой цепи (rBoNT/A-LC) и рецепторсвязывающему домену тяжелой цепи ботулотоксина типа А (rBoNT/A-НС50) *Clostridium botulinum* получены методами PEG-опосредованного слияния и электрослияния. Скрининг иммуноглобулинов класса G к целевым белкам осуществлен методом непрямого твердофазного ИФА. Мышам внутрибрюшинно вводили гибридные клетки-продуценты для индуцирования асцитической опухоли, содержащей МКА, которые очищали из асцитической жидкости мышей с применением методов хроматографии: аффинной на сорбенте Protein G с последующей гель-фильтрацией на колонке с сорбентом Superdex 200.

Анализ антигитоксической активности МКА в отношении ботулотоксина типа А проведен методом биологической пробы мышей в несколько этапов. В каждой серии экспериментов участвовали беспородные самки мышей массой 18–20 г по 3–5 животных на группу (питомник ФБУН ГНЦ ПМБ). Для обеспечения воспроизводимости полученных данных использован коммерческий препарат «Миотокс» (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»), содержащий 100 ед/мл ботулотоксина типа А, одной производственной партии. Каждый эксперимент выражался в подборе дозировки токсина (2-3LD50, где LD50 является 1 ед) и смеси МКА (не превышающей 100 мкг), оказывающей токсиннейтрализующий эффект. Мышам внутрибрюшинно вводили смесь одного или нескольких МКА и ботулотоксина в PBS в общем объеме 150 мкл. Каждый этап эксперимента завершался через сутки после того, как последнее животное пало.

### Результаты и выводы

В эксперименте участвовали 13 МКА к rBoNT/A-LC и 2 к rBoNT/A-НС50. На первом этапе удалось выяснить, что среди полученных антител существует одно, которое способно обеспечивать полную выживаемость мышей при дозе токсина 2LD50. Оно (mab\_CB-LCA\_2-55) и еще несколько МКА, которые показали положительную динамику, были отобраны для следующего этапа, где использовались уже попарно в соотношении 1 : 1. В ходе данного этапа выделили пары, которые при той же дозировке токсина не только способствовали выживаемости всех животных, но и позволяли им избежать негативных последствий влияния токсина или восстановиться до конца эксперимента. На последнем этапе дозировка токсина была повышена до 3LD50, и в нем участвовали самые эффективные антитела в парном и тройном сочетании с понижением дозировок МКА. Дополнительно проводился контроль веса и самочувствия животных. Удалось выяснить, что сочетания антител mab\_CB-LCA\_2-55 + mab\_CB-НСА\_1-8 (по 50 мкг), mab\_CB-LCA\_2-55 + mab\_CB-НСА\_2-11 (по 50 мкг), mab\_CB-LCA\_2-55 + mab\_CB-НСА\_1-8 + mab\_CB-LCA\_1-4 (по 25 мкг) и mab\_CB-LCA\_2-55 + mab\_CB-НСА\_2-11 + mab\_CB-LCA\_1-4 (по 25 мкг) с равноценной эффективностью нивелируют действие токсина. При этом негативное действие токсина никоим образом не сказывается на мышах, и они набирают вес аналогично животным в группе отрицательного контроля. Данные МКА будут использоваться в дальнейших исследованиях для разработки препаратов на основе гуманизированных антител.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 31.10.2019 г. № 075-15-2019-1671).

© Н. А. Зенинская, М. А. Марьин, А. К. Рябко, А. С. Карцева, М. В. Силкина, Т. И. Комбарова, Я. О. Романенко, М. М. Рогозин, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова, 2022

## ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МОКСИФЛОКСАЦИНА, ЗАГРУЖЕННОГО В МАННОЗИЛИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ К МАКРОФАГАМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕННЫХ ФОРМ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ\*

И. Д. Злотников, М. Р. Данилов, М. П. Давыдова, Е. В. Кудряшова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

✉ izlotnikov2003@yandex.ru

### Аннотация

Маннозилированные полимерные системы на основе маннана, циклодекстринов и полиэтиленimina увеличили период полувыведения моксифлоксацина из организма крыс *Wistar* более чем в 10 раз и повысили органную биодоступность, в том числе накопление в легких более чем в 7 раз, что позволит усилить существующие методики терапии инфекционных заболеваний.

Перспективное направление в лечении осложненных инфекционных заболеваний дыхательных путей — разработка комбинированных форм препаратов на основе фторхинолонов. Острая проблема — резистентные штаммы патогенов и дремлющие бактерии, локализованные в гранулах. В настоящей работе предложена концепция целенаправленного избирательного воздействия на бактерии (а в будущем и на раковые клетки) с возможностью обхода лекарственной устойчивости патогенов за счет адресной доставки фторхинолонов к макрофагам путем нацеливания на маннозные рецепторы.

Реализация концепции основана на создании олиго- и полимерных систем доставки лекарств [1]: маннан с привитыми циклодекстринами (ЦД) и маннозилированные полиэтиленимины (ПЭИ) с привитыми ЦД. Молекулярные контейнеры высокоаффинны к маннозным рецепторам (константы диссоциации комплексов с модельным белком ConA лучше, чем  $10^{-6}$  М), способны загружать до 25 % по массе терапевтического средства и пролонгировано высвобождать с улучшением фармакокинетических характеристик (см. таблицу). Моксифлоксацин (МФ) в составе полимерных частиц дольше циркулирует в организме модельных животных ( $\tau_{1/2}$  увеличен до 15 раз), соответственно, уменьшен клиренс от 2 до 10 раз.

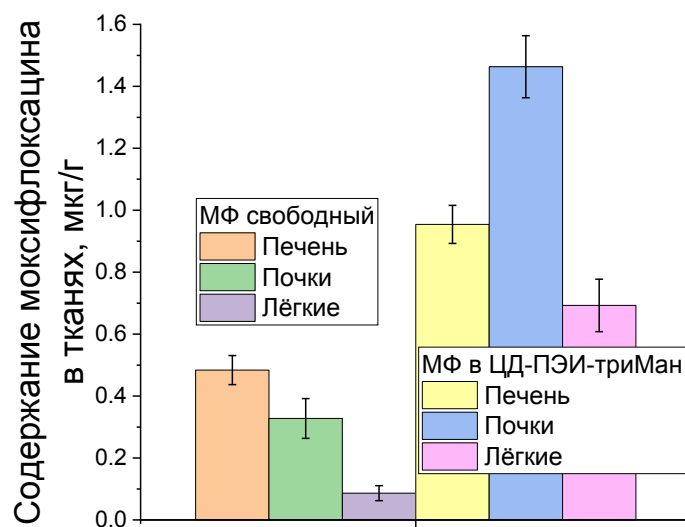
### Фармакокинетические параметры МФ в свободной форме и виде комплексных формуляций с маннозилированными молекулярными контейнерами

Параметр	МФ свободный	МФ в маннан-ЦД	МФ в ЦД-ПЭИ-триМан
Модель	Однокамерная без поглощения	Двухкамерная без поглощения	Однокамерная с поглощением
Период полувыведения $\tau_{1/2}$ , мин	14,3 ± 0,7	215 ± 7	20 ± 3
Объем распределения $V_d$ , л	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,3	0,6 ± 0,1
Клиренс, мл/мин	78 ± 4	7 ± 1	29 ± 2
Площадь под кривой (AUC)	64 ± 5	710 ± 20	170 ± 10

Примечание. На крысах породы *Wistar* весом 300 ± 20 г.

Молекулярные контейнеры позволяют втрое увеличить суммарное действующее количество МФ (см. рисунок), при этом значительно повышают накопление МФ в легких с 0,1 до 0,7 мкг/г за счет таргетирования макрофагов. Адресная доставка фторхинолонов открывает новые возможности для воздействия на сложные инфекции. Настоящие данные в сочетании с предыдущими разработками молекулярных контейнеров для доставки усиленных адьювантами (эвгенол, апиол) лекарств формируют основу для выбора оптимального комплексного препарата для конкретной терапевтической задачи и, возможно, для конкретного пациента [2].

\* Данное исследование профинансировано Российским научным фондом (грант № 22-24-00604). Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-спектрометр Bruker Tensor 27 и спектрометр Jasco J-815 CD) программы развития Московского государственного университета.



Содержание моксифлоксацина в печени, почках и легких крыс *Wistar* через 40 мин после введения 5 мг МФ внутривенно

### Литература

1. Zlotnikov I. D., Kudryashova E. V. Spectroscopy Approach for Highly-Efficient Screening of Lectin-Ligand Interactions in Application for Mannose Receptor and Molecular Containers for Antibacterial Drugs // *Pharmaceuticals*. 2022. Vol. 15 (5). P. 625.
2. Zlotnikov I. D., Belogurova N. G., Krylov S. S. et al. Plant Alkylbenzenes and Terpenoids in the Form of Cyclodextrin Inclusion Complexes as Antibacterial Agents and Levofloxacin Synergists // *Pharmaceuticals*. 2022. Vol. 15 (7). P. 861.



## НАПРАВЛЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЕНА *Myc2*, СВЯЗАННОГО С ГОЛУБОЙ ОКРАСКОЙ ЗЕРНА ЯЧМЕНЯ\*

Т. Е. Зыкова<sup>1,2</sup>, А. А. Егорова<sup>1,2</sup>, К. В. Стрыгина<sup>4</sup>, О. Ю. Шоева<sup>1</sup>, М. А. Генаев<sup>1</sup>,  
Е. Г. Комышев<sup>1</sup>, И. Д. Бусов<sup>2</sup>, К. Хертиг<sup>3</sup>, С. В. Герасимова<sup>1,2,4</sup>, И. Коэппель<sup>3</sup>, Ш. Хикель<sup>3</sup>,  
А. М. Короткова<sup>1</sup>, А. В. Вихорев<sup>1,2</sup>, Й. Кумлен<sup>3</sup>, Е. К. Хлесткина<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup>Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур  
им. Лейбница, Гатерслебен, Германия

<sup>4</sup>Всероссийский институт генетических ресурсов растений  
им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург

✉ t.zykova@g.nsu.ru

### Аннотация

Данное исследование направлено на получение растений ячменя с голубой окраской зерновок из неокрашенных зерен сорта *Golden Promise* путем агробактериальной трансформации. Используются конструкции, несущие систему gRNA/Cas9, нацеленную на два разных сайта в гене *Myc2* для восстановления его исходной рамки считывания.

Окраска зерен ячменя (*Hordeum vulgare* L.) определяется набором пигментов в разных слоях их оболочки. Например, при накоплении антоцианов в алейроновом слое зерновки могут приобретать голубую окраску. Данные соединения обладают выраженной антиоксидантной активностью и играют важную роль в модуляции физиологических процессов организма, что может быть использовано в функциональном питании. Получение новых разновидностей ячменя с повышенным содержанием антоцианов в оболочках зерен — важная биотехнологическая задача.

В ходе предыдущих исследований установлена связь транскрипционного фактора *Myc2* с активацией транскрипции генов ферментов пути биосинтеза антоцианов и с накоплением голубого пигмента в алейроновом слое [1]. Показано, что однонуклеотидная инсерция в гене *Myc2* приводит к сдвигу рамки считывания и появлению неокрашенного фенотипа. Цель работы — восстановление рамки считывания в кодирующей последовательности гена *Myc2* в неокрашенном сорте ячменя при помощи РНК-направленной эндонуклеазы *Cas9*, способной эффективно вносить небольшие делеции в целевой участок.

Созданы две конструкции, каждая из которых содержала ген нуклеазы *Cas9* и ген направляющей РНК, соответствующий одному из двух сайтов-мишеней, выбранных на кодирующей последовательности гена *Myc2*. Оценка активности конструкций проведена на протопластах ячменя, после чего методом агробактериальной трансформации незрелых зародышей получены мутантные растения. Трансформация выполнена на модельном сорте *Golden Promise*, имеющем неокрашенные зерновки. В поколении T0 получено 49 мутантных растений, из которых 8 использовано для последующего получения поколений T1 и T2.

Фенотипические характеристики анализировались путем получения и сравнения изображений зерновок поколения T3. Статистическая обработка данных проводилась в 4 разных цветовых моделях (RGB, HSV, Lab, YCrCb). Достоверные отличия выявлены по синему компоненту цвета зерен между группой мутантов с делецией –4 пн и исходным неокрашенным сортом. Зафиксированные отличия могут быть признаком восстановления функции гена и накопления антоцианов в зерновках мутантных растений.

### Литература

1. Strygina K. V., Börner A., Khlestkina E. K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone // BMC Plant Biol. 2017. Vol. 17 (1). P. 184.

\* Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№ 21-66-00012).

© Т. Е. Зыкова, А. А. Егорова, К. В. Стрыгина, О. Ю. Шоева, М. А. Генаев, Е. Г. Комышев, И. Д. Бусов, К. Хертиг, С. В. Герасимова, И. Коэппель, Ш. Хикель, А. М. Короткова, А. В. Вихорев, Й. Кумлен, Е. К. Хлесткина, 2022

## ЦИКЛИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФОТОАКТИВИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9\*

Е. В. Иванская, Л. В. Саковина, Е. С. Горленко, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина

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

✉ e.agalakova@g.nsu.ru

### Аннотация

Одним из вариантов контроля активности систем геномного редактирования CRISPR/Cas является использование фоточувствительных направляющих РНК. Данная работа направлена на получение циклических фотоактивируемых crРНК для системы CRISPR/Cas9. Реализован дизайн, синтез конструкций олигорибонуклеотидов и осуществлена их циклизация. Продемонстрирована возможность фотоактивируемого расщепления модельной плазмиды системой CRISPR/Cas9, содержащей циклические фотомодифицированные направляющие crРНК.

Ранее нами были разработаны и использованы фоточувствительные направляющие РНК, содержащие фоторасщепляемые группировки в середине цепи, которые при облучении разрушаются, при этом действие системы CRISPR/Cas9 останавливается [1]. В качестве включения системы путем облучения светом мы предложили другой вариант конструкции, имеющий дополнительный фоторасщепляемый олигонуклеотид, который исходно блокирует направляющую РНК, а после облучения высвобождает ее, при этом система геномного редактирования активируется [2, 3].

В данной работе для создания фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9 нами было предложено использовать циклические фоторасщепляемые направляющие crРНК, которые должны значительно хуже взаимодействовать с мишенью, tracrРНК и белком Cas9, в связи с чем система CRISPR/Cas9 не будет проявлять активности. После облучения светом с длиной волны 365 нм циклические РНК переходят в линейную форму, узнаются другими компонентами системы редактирования генома и могут взаимодействовать с ДНК-мишенью, что приводит к активации системы CRISPR/Cas9 (рис. 1).

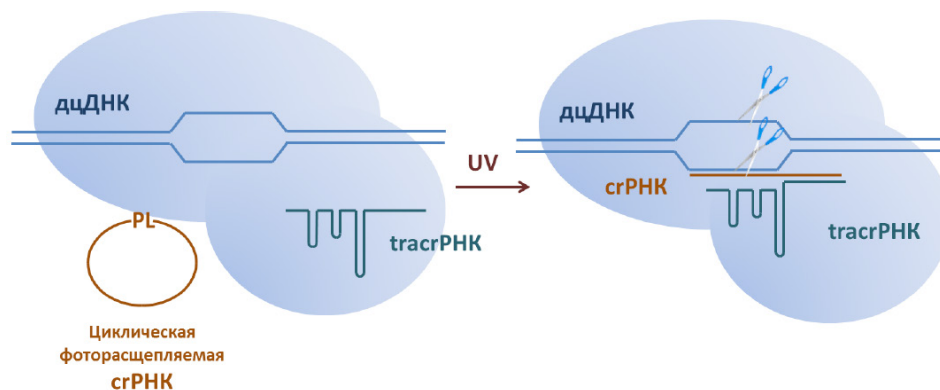


Рис. 1. Фотоактивация системы CRISPR/Cas9, PL — фотолинкер. А — ДНК-мишень и компоненты фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9 до облучения. Б — активация системы геномного редактирования CRISPR/Cas9

Синтез исходных crРНК и введение фотолинкера осуществляли твердофазным фосфитамидным автоматическим методом. Для циклизации предварительно вводили алкиновую группировку на 3'-конец и азидогруппу на 5'-конец олигорибонуклеотидов, затем проводили реакцию азид-алкинового циклоприсоединения в водно-органической среде в присутствии одновалентной меди.

При исследовании эффективности расщепления плазмиды в системе CRISPR/Cas9 показано, что белок Cas9 в присутствии циклических немодифицированных crРНК, не содержащих фотолинкер, значительно хуже

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-14-00294).

© Е. В. Иванская, Л. В. Саковина, Е. С. Горленко, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина, 2022

расщепляет плазмидную ДНК, чем в присутствии их линейных аналогов. На основании полученных данных разработан дизайн и синтезированы фотоблокированные направляющие олигорибонуклеотиды длиной 46 и 48 нуклеотидов, содержащие один или два фотолинкера в шпильчатой структуре (рис. 2).

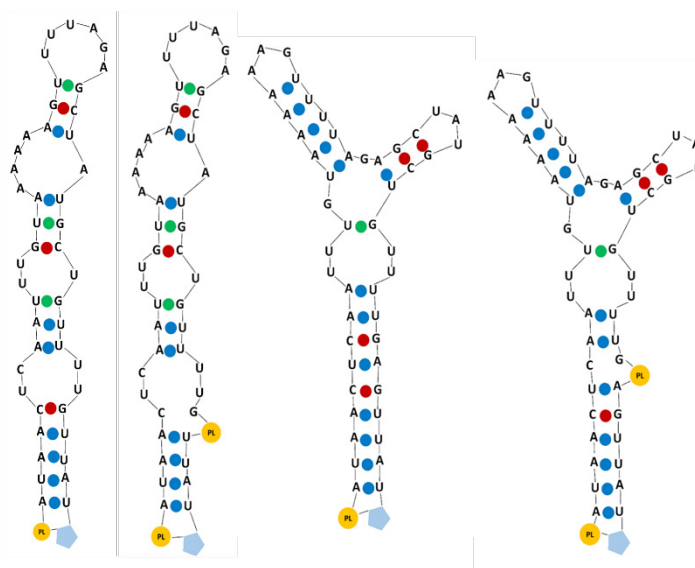


Рис. 2. Фотоблокированные направляющие crРНК длиной 46 и 48 нуклеотидов, содержащие один или два фоторасщепляемых линкера

После облучения фотоблокированных циклических олигорибонуклеотидов показано увеличение эффективности расщепления плазмидной ДНК в системе CRISPR/Cas9 по сравнению с необлученными образцами.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности разрабатываемого подхода к созданию фотоконтролируемых систем геномного редактирования.

### Литература

1. Пат. 2765159 Российская Федерация. Модифицированная направляющая РНК, обладающая способностью инактивировать систему редактирования генома CRISPR/Cas9, и способ ее получения / Новопашина Д. С. и др.
2. Ахметова Е. А. и др. Фотоактивируемая система CRISPR/Cas9 // Биоорган. химия 2021. Т. 47. С. 276–286.
3. Semikolenova O. et al. Photoactivatable nanoCRISPR/Cas9 system based on crRNA reversibly immobilized on carbon nanoparticles // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. P. 10919.

## ОЦЕНКА БИОРАЗНООБРАЗИЯ И АНАЛИЗ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ\*

Н. А. Имидоева, Е. В. Переляева, М. Е. Дмитриева,  
В. Н. Шелковникова, А. Ю. Бельшенко, Д. В. Аксенов-Грибанов

*Иркутский государственный университет*

✉ [natasha-imideva@rambler.ru](mailto:natasha-imideva@rambler.ru)

### Аннотация

Исследования, посвященные возможности микроорганизмов осуществлять процессы биологической деструкции веществ различного происхождения, очень актуальны. Особое значение для таких исследований представляют бактерии – обитатели древних экосистем, например озера Байкал. Поскольку экосистема озера характеризуется прежде всего низкой температурой воды, микроорганизмы, адаптировавшиеся к таким условиям, являются психрофильными и могут выступать в качестве возможного источника уникальных природных соединений, обладающих различными биомедицинскими эффектами.

В ходе проведенных работ выделены психрофильные бактерии-деструкторы с поверхности отходов лесопиления, погруженных в озеро Байкал. Полученные пробы были посеяны газоном на 4 видах различных по составу питательных сред, в том числе на среду Гетчинсона – специфическую для целлюлозоразрушающих бактерий. Выделение чистых культур бактерий происходило в условиях холодильной камеры при температуре +5 °С. Так, получено 338 бактериальных культур, 128 из которых — с питательной среды Гетчинсона. Это говорит о том, что данные бактерии, по-видимому, являются бактериями-деструкторами. Штаммов идентифицировали посредством амплификации гена 16S рНК. Обнаружены представители как широко распространенных родов (*Pseudomonas* sp. и *Arthrobacter* sp.), так и редких (*Janthinobacterium* sp., *Cryobacterium* sp., *Pseudarthrobacter* sp., *Pseudoclavibacter* sp.). Проанализировав литературные данные, установили, что представители родов *Janthinobacterium*, *Cryobacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudoclavibacter* упоминаются в единичных исследованиях, проводимых в экосистеме оз. Байкал.

Для проведения экстракции и последующего анализа антимикробной активности идентифицированные байкальские штаммы культивировали на питательной среде с добавлением отходов лесопиления — опилок хвойных и лиственных пород. Показано, что данные микроорганизмы представляют большую ценность для биотехнологических разработок и обнаружения новых природных соединений с биологической активностью. В ходе исследования, при визуальном осмотре посевов и оценке роста на питательных средах, содержащих отходы лесопиления, установлено, что штаммы *Pseudomonas* sp. и *Janthinobacterium* sp. могут расти на всех типах сред с различной концентрацией опилок. Напротив, штаммы *Pseudoclavibacter* sp. и *Cryobacterium* sp. не способны к росту с добавлением отходов лесопиления. Анализ антибиотической активности штаммов психрофильных микроорганизмов показал зоны ингибирования только у штаммов, культивируемых на сосновых опилках. Штамм *Pseudomonas* sp. может синтезировать наибольшее число антибиотических соединений, так как его экстракты ингибировали рост всех тест-культур. Кроме того, штаммы *Janthinobacterium* sp., культивируемые на питательной среде, содержащей сосновые опилки, способны ингибировать рост тестовых культур. Такая особенность может свидетельствовать о запуске адаптации данных штаммов к росту на труднодеградируемом сырье.

\* Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно-образовательных центрах (проект № 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал) и Гранта Президента РФ (МК-1245.2021.1.4).

## СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ МАССОЙ МЕНЕЕ 5 КДА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

С. А. Ищук, А. В. Казакова

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

✉ Sergey.Ishchuk@geropharm.com

### Аннотация

В работе представлены результаты разработки технологии получения и последующей очистки пептидов менее 5 кДа высокой частоты, пригодных для терапевтического использования. Получено и очищено 4 пептида с различными физико-химическими свойствами по общей технологии для всех пептидов. Преимущества данной технологии в ее универсальности и масштабируемости.

Экспрессия терапевтических пептидов в бактериальных системах, например в кишечной палочке, имеет большое количество преимуществ, таких как высокая удельная продуктивность, низкая себестоимость производства, большой потенциал оптимизации, хорошая изученность процесса. Однако у данной системы есть ряд ограничений: отсутствие посттрансляционных модификаций, невозможность правильного формирования третичной структуры, большие трудности с экспрессией белков более 60 кДа и менее 5 кДа. Поэтому очень важным является формирование подходов, позволяющих обойти эти ограничения, при этом сохранив все преимущества бактериальной экспрессии. Создание штаммов бактерий, экспрессирующих терапевтические пептиды молекулярной массой менее 5 кДа, — крайне сложная и трудоемкая задача из-за быстрой деградации протеолитическими ферментами клетки либо высокой цитотоксичности целевого продукта. Для решения подобных задач проводят экспрессию пептида в виде тандемных повторов или гибридного белка, слитого с другим крупным белком, например SUMO. Использование тандемных повторов может быть проблематично при последующем рефолдинге ввиду высокой склонности таких белков к агрегации и сложности очистки после ферментативного гидролиза из-за большого количества близкородственных примесей.

В отделе биотехнологий «Фарм-Холдинг» стояла задача получения 4 пептидных антигенов с молекулярной массой 2,9; 2,7; 2,6 и 3,8 кДа. Принято решение использовать технологию SUMO-слитого белка в качестве модульной, т. е. одинаковой для получения всех пептидов. Основным минусом мог стать низкий выход целевого продукта, который впоследствии можно было увеличить оптимизацией условий ферментации.

### Материалы и методы

Для получения генетических конструкций применяли рестрикционно-лигазный метод клонирования. Для экспрессии целевых белков выбран штамм-хозяин BL21. Культивирование штаммов-продуцентов проводили в биореакторах Biostat В; дезинтеграцию клеточной биомассы — с помощью гомогенизатора высокого давления. Аффинная хроматография выполнена с использованием Ni-NTA агарозы и хроматографа низкого давления АКТА Avant, фирмы Cytiva, элюцию проводили бесступенчатым повышением имидозола. ВЭЖХ-очистку осуществляли на сорбенте SP-100-C8-PK, фирмы Daisogel, элюцию — линейным повышением изопропанола, гидролиз SUMO-слитого белка — специфичной ULP1 протеазой собственного производства.

### Результаты

Целевые гибридные белки выделили из бактериальных клеток, очистили с помощью трехстадийной хроматографической очистки, включающей металл-аффинную хроматографию, ферментативный гидролиз высокоспецифичной SUMO-протеазой, последующую металл-аффинную хроматографию уже целевых пептидных антигенов и финальную очистку высокоэффективной жидкостной хроматографией. После этого пептиды лиофильно высушили. Масса всех гибридных белков и пептидов подтверждена с помощью ВЭЖХ-МС, подлинность пептидных антигенов дополнительно подтверждалась специфическим ИФА-набором. Такие пептиды имели чистоту более 95 % по ОФ-ВЭЖХ. Данная схема позволяет получать продукт высокой чистоты, пригодный для терапевтических целей. Использование аффинной хроматографии и общего гибридного белка предшественника дает возможность получить 4 пептида с различными физико-химическими свойствами по общей технологии для всех пептидов.

**Выводы**

Создана модульная платформа получения и последующего выделения и очистки терапевтических пептидов с различными физико-химическими свойствами и разной молекулярной массой при сохранении всех преимуществ бактериальной системы экспрессии.

**Литература**

1. Mo Q. et al. Expression and purification of antimicrobial peptide AP 2 using SUMO fusion partner technology in *Escherichia coli* // Lett. Appl. Microbiol. 2018. Vol. 67, № 6. P. 606–613.

## ПОДБОР УСЛОВИЙ РЕФОЛДИНГА Fc-FUSION БЕЛКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ДИЗАЙНА ЭКСПЕРИМЕНТА

А. В. Казакова, С. А. Ищук, А. Д. Яштубаева

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

✉ Angelina.Kazakova@geropharm.com

### Аннотация

Основным недостатком использования *E. coli* в качестве экспрессионной системы является необходимость проведения дополнительной стадии рефолдинга при очистке белка для возвращения молекулы в нативную форму из нерастворимых телец включения. В данной работе для решения этой трудоемкой задачи применен подход «дизайн эксперимента» (DoE). На этапе скрининга исследованы шесть параметров, предположительно оказывающих влияние на процесс. Результаты эксперимента проанализированы с помощью программного обеспечения для дизайна эксперимента. Выявлены три фактора, статистически значимо влияющие на процесс рефолдинга. На этапе оптимизации построена математическая модель процесса, определены оптимальные условия, протестированные экспериментально. Полученные значения подтвердили надежность прогнозов построенной модели. Применение дизайна эксперимента позволило увеличить выход белка на этапе рефолдинга на 30 % по сравнению с неоптимизированной технологией, а чистоту — до 40 %, что в результате привело к повышению общего выхода целевого белка на этапе очистки.

В настоящее время *Escherichia coli* — одна из наиболее распространенных систем экспрессии рекомбинантных белков [1]. Ее основным преимуществом является высокая скорость роста на недорогих средах. Недостатком *E. coli* считается получение белков в форме нерастворимых агрегатов, называемых тельцами включения. Большая часть белков в них присутствует в неактивной форме, поэтому требуется дополнительная стадия восстановления их биологической активности — рефолдинг [2]. Разработка стадии рефолдинга представляет собой нетривиальную задачу и может занимать длительное время, если подбор оптимальных условий осуществляется методом проб и ошибок.

В данной работе использован высокопроизводительный подход к разработке стадии рефолдинга — дизайн эксперимента (*design of experiments*, DoE). Основная идея метода заключается в том, чтобы одновременно исследовать влияние многих факторов на систему в рамках набора запланированных экспериментов и далее соединить результаты с помощью математической модели. Такой подход позволяет получить наибольшее количество информации из собранных данных.

В представленной работе объект исследования — Fc-fusion белок, имеющий молекулярную массу около 60 кДа и содержащий шесть фрагментов цистеина в каждой цепи. Подбор параметров рефолдинга осуществляли в три этапа: скрининг, оптимизация и валидация.

Основная задача первого этапа — поиск факторов, влияющих на процесс рефолдинга. Для этого в ходе 32 экспериментов, сгенерированных с помощью программного обеспечения MODDE®, исследовано влияние шести факторов: температуры, pH буфера, содержания белка в растворе, количества восстановителя, соотношения «окислитель — восстановитель», длительности рефолдинга. В качестве откликов использовались количественное содержание целевого белка в растворе и его хроматографическая чистота, определенные методом RP-HPLC. Анализ результатов выявил два фактора, влияющих на выход белка на стадии рефолдинга: температуру и содержание белка в растворе. Для обоих факторов зафиксирована отрицательная корреляция с выходом. Также показано, что на хроматографическую чистоту белка среди выбранных показателей статистически значимое влияние оказывает только соотношение «окислитель — восстановитель». Для этого показателя установлена положительная корреляция с чистотой.

Далее факторы, оказывающие статистически значимое влияние на выход целевого белка и его чистоту, были дополнительно изучены на втором этапе исследования — оптимизации. Его основной задачей являлось построение математической модели, охватывающей оптимальные условия процесса. Для этого с помощью программного обеспечения MODDE® составили план, состоящий из 20 экспериментов. Для параметров, не оказывающих влияние на процесс, выбраны фиксированные значения. В качестве откликов использовались количественное содержание целевого белка в растворе и его хроматографическая чистота, определенные методом RP-HPLC. Анализ результатов позволил установить оптимальные значения температуры проведения рефолдинга, содержания белка в растворе и соотношения «окислитель — восстановитель».

Оптимальные условия, предложенные программным обеспечением MODDE®, были далее проверены экспериментально — проведением рефолдингов большего масштаба. Полученные значения выходов и чистоты

целевого белка подтвердили надежность прогнозов построенной модели. Применение подхода «дизайн эксперимента» позволило увеличить выход белка на этапе рефолдинга на 30 % по сравнению с неоптимизированной технологией, а чистоту — до 40 %, что в результате привело к повышению общего выхода целевого белка на этапе очистки.

#### **Литература**

1. Demain A. L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // *Biotechnol. Adv.* 2009. Vol. 27 (3). P. 297–306.
2. Basu A., Li X., Leong S. S. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 92 (2). P. 241–251.



## ПРИМЕНЕНИЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ В СОСТАВЕ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ УСТРОЙСТВ

В. С. Казачкова<sup>1</sup>, Ю. В. Плеханова<sup>2</sup>, Т. В. Семашко<sup>3</sup>, Н. А. Кленова<sup>1</sup>, А. Н. Решетилов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С. П. Королева

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН — обособленное подразделение  
Федерального исследовательского центра «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»

<sup>3</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

✉ viksha63@mail.ru

### Аннотация

Один из методов улучшения аналитических характеристик биоэлектрохимических устройств — включение в их состав наноматериалов. Рассматривали иммобилизацию глюкозооксидазы из двух источников на поверхности графитовых электродов, модифицированных ПЭДОТ : ПСС с графеном. Сравнили электрохимические характеристики ферментов в составе биосенсоров и биотопливных элементов (БТЭ).

В настоящее время существует большое количество биосенсоров и БТЭ, предназначенных для количественного определения глюкозы. В основном такие устройства основаны на электрохимических датчиках с ферментом глюкозооксидазой (ГОД) в качестве рецепторного элемента [1]. Данный фермент катализирует окисление глюкозы, при этом регистрируется ток, генерируемый в результате переноса электронов от активного центра фермента на электрод. Главный этап создания таких устройств — иммобилизация фермента на поверхности электрода. Для этого, а также для улучшения характеристик в последнее время используют полимер поли(3,4-этилендиокситиофен) : полистеренсульфоновая кислота (ПЭДОТ : ПСС) с наноматериалами. Это позволяет увеличить площадь активной поверхности сенсоров, улучшить каталитические свойства электродов, изменить их физические параметры (гибкость, растяжимость, прочность и т. д.), добиться создания наноразмерных сенсоров [2, 3].

Цель данной работы — изучение электрохимических характеристик фермента ГОД из различных источников в составе электрохимического биосенсора, модифицированного проводящим полимером ПЭДОТ : ПСС/графен.

В качестве рабочих электродов использовали два типа графитовых электродов: 3-контактные электроды, полученные методом матричной печати (ООО «КолорЭлектроникс», Москва), а также стержни из графита спектральной чистоты (ООО «Полипроф-Л», Москва). Электроды модифицировали проводящими чернилами ПЭДОТ : ПСС/графен (Sigma, USA). Объектом исследования являлись ГОД, синтезируемые *Aspergillus niger* (Sigma, USA) и *Penicillium funiculosum* (Институт микробиологии НАН Беларуси), иммобилизованные в гель хитозана на поверхности модифицированных графитовых электродов.

Оценку электрохимических характеристик композиций с ГОД проводили методами хроноамперометрии и циклической вольтамперометрии. На рис. 1 представлены типичные циклические вольтамперограммы биоэлектрода на основе одного из ферментов в различных измерительных средах. Для оценки аналитических характеристик глюкозных биосенсоров построены калибровочные зависимости (рис. 2). Аналитические параметры, вычисленные из калибровочных зависимостей для каждого электрода, представлены в табл. 1.

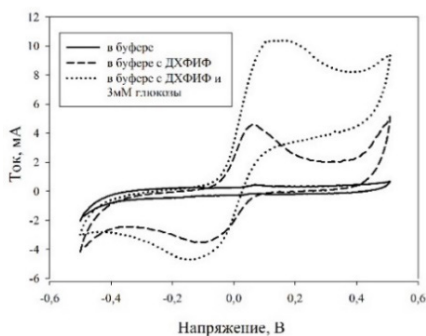


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы электродов с ГОД *P. funiculosum*

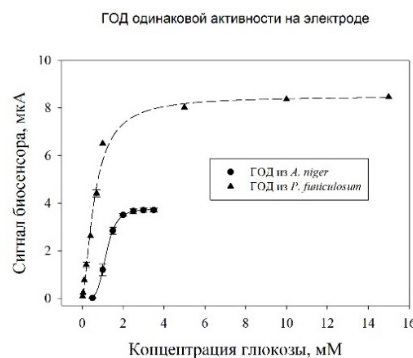


Рис. 2. Калибровочные зависимости для определения глюкозы с помощью биосенсоров

### Аналитические характеристики биосенсоров и БТЭ на основе ГОД

Параметр	Источник ГОД	
	<i>A. niger</i>	<i>P. funiculosum</i>
<b>Биосенсор</b>		
$I_{\max}$ , мкА	3,8	16,1
$K_M$ , мМ	1,2	0,6
Диапазон детекции, мМ	0,8-1,9	20,0 нМ — 1,8 мМ
Линейный диапазон детекции, мМ	0,80-1,50	80 нА — 0,70 мА
Коэффициент чувствительности, мкАмМ <sup>-1</sup>	3,6	7,1
<b>БТЭ</b>		
Мощность БТЭ, мВт/см <sup>2</sup>	2,71	4,25
Внутреннее сопротивление, кОм	3008,33	2861,87

Биосенсор на основе ГОД *P. funiculosum* обладает широким диапазоном определения глюкозы от 20,0 нМ до 1,8 мМ, при этом чувствительность к глюкозе на линейном участке зависимости составляет 7,1 мкА\*мМ<sup>-1</sup>. Биосенсор на основе ГОД *A. niger* имеет более узкий диапазон определения (0,8–1,9 мМ) и более низкую чувствительность к глюкозе (3,6 мкА\*мМ<sup>-1</sup>). БТЭ на основе ГОД *P. funiculosum* генерировал мощность в 2 раза выше, чем на основе ГОД *A. niger*, при примерно одинаковых внутренних сопротивлениях обоих макетов БТЭ.

Таким образом, композиция ПЭДОТ : ПСС/графен/хитозан может эффективно использоваться в глюкозных биосенсорах на основе печатных электродов и ферментных топливных элементов для иммобилизации глюкозооксидазы. Оба исследованных фермента могут быть перспективны при создании биосенсоров и БТЭ для практического элемента.

#### Литература

1. Tarasov S. E., Plekhanova Y. V., Rai M., Reshetilov A.N. Nano- and microelectrochemical biosensors for determining blood glucose // Rai M., Reshetilov A., Plekhanova Y. and Ingle A. P. Macro-, Micro- and Nano-Biosensors: Potential Applications and Limitations. Springer, 2021. P. 265–284.
2. Cash K. J., Clark H.A. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes // Trends Mol. Med. 2010. Vol. 16, № 12. P. 584–593.
3. Фиалков А. С. Углерод, межслоевые соединения и композиты на его основе. М. : Аспект Пресс, 1997. 720 с.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КОНЬЮГАТА ПОЛИАМИННОГО ЛИГАНДА С ТАРГЕТНЫМ ПЕПТИДОМ \*

М. И. Камалов<sup>1</sup>, Р. И. Гарифуллин<sup>1</sup>, А. В. Немтарёв<sup>2</sup>, Р. А. Ишкаева<sup>1</sup>,  
М. В. Эсметьева<sup>1</sup>, Д. В. Салахиева<sup>1</sup>, Т. И. Абдуллин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А. М. Бутлерова

✉ kamalovmi@gmail.com

### Аннотация

Синтезированы и охарактеризованы полиаминный лиганд диэтилентриаминил-N'-глицин и его конъюгат с таргетным пептидом RGD. Оценено влияние лиганда/конъюгата на каталитическую способность некоторых переходных металлов, а также цитотоксическая активность соединений.

Комплексные соединения на основе переходных металлов и пептидов являются перспективными биомиметирующими системами, обладающими различными физико-химическими и биохимическими свойствами, в частности способностью катализировать биологически значимые гидролитические и окислительно-восстановительные реакции [1]. Цель настоящей работы — получение и характеристика конъюгата полиаминного лиганда диэтилентриаминил-N'-глицина (*dienac*) с модельным таргетным пептидом RGD, связывающимся с интегринами опухолевых клеток [2]. С помощью жидкофазного синтеза получены *dienac* и его защищенное производное с трет-бутильными группами N,N-бис[(трет-бутилоксикарбонил)аминоэтил]глицин (*Bocdienac*). Посредством твердофазного синтеза пептидов с использованием *Fmoc*-защищенных аминокислот и защищенного лиганда получен конъюгат *dien-GGRGD-NH<sub>2</sub>*. Структуру соединений верифицировали методами ИК-Фурье-, ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

Исследовано влияние *dienac* и *dien-GGRGD-NH<sub>2</sub>* отдельно и в комплексе с марганцем и кобальтом на жизнеспособность клеток млекопитающих. Установлено, что оба лиганда не проявляют выраженного цитотоксического эффекта, при этом модулируя жизнеспособность клеток в присутствии металлов.

С использованием тетразолиевого индикатора оценена способность *dienac* и *dien-GGRGD-NH<sub>2</sub>* в композиции с металлами инактивировать супероксид-радикал, генерируемый при восстановлении молекулярного кислорода. Установлено, что оба лиганда не проявляют значительного модулирующего эффекта на металл-опосредованную дисмутацию супероксид-радикала.

Для изучения способности *dienac* и *dien-GGRGD-NH<sub>2</sub>* в комплексе с металлами ускорять реакцию гидролиза АТФ применена колориметрическая методика определения неорганического фосфата в присутствии молибдата аммония. Оптимизированы условия, обеспечивающие незначительный уровень спонтанного гидролиза АТФ ≤ 2 %. В этих условиях проведена сравнительная оценка АТФ-гидролизующей активности синтезированных лигандов и комплексов. Полученные результаты представляют интерес в создании биоактивных комплексов пептидных соединений с каталитически активными металлами.

### Литература

1. Studer S., Hansen D. A., Pianowski Z. L. et al. Evolution of a highly active and enantiospecific metalloenzyme from short peptides // *Sci.* 2018. Vol. 362 (6420). P. 1285–1288.
2. Zoughaib M., Pavlov R., Gaynanova G. et al. Amphiphilic RGD and GHK peptides synergistically enhance liposomal delivery into cancer and endothelial cells // *Mater. Adv.* 2021. Vol. 2. P. 7715–7730.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-10105).

© М. И. Камалов, Р. И. Гарифуллин, А. В. Немтарёв, Р. А. Ишкаева, М. В. Эсметьева, Д. В. Салахиева, Т. И. Абдуллин, 2022

## ПОЛУЧЕНИЕ АМФИФИЛЬНОГО СОПОЛИМЕРА СТИРОЛА И МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИПОСОМАМИ\*

М. И. Камалов, Д. В. Савенкова, Р. Г. Киямова, А. В. Немтарёв, Т. И. Абдуллин

*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

✉ kamalovmi@gmail.com

### Аннотация

Синтезированы и охарактеризованы мембранотропные сополимеры стирола и малеиновой кислоты с контролируемым соотношением мономеров. Исследованы условия образования мембранных наноструктур при ассоциации сополимеров с модельными липосомами.

Амфифильные полимеры (АП) — важные молекулярные инструменты в различных биомедицинских приложениях. АП успешно используются в качестве систем доставки низкомолекулярных лекарств и биомакромолекул, клеточных модуляторов и компонентов различных биоматериалов [1]. Мембранотропные свойства АП могут применяться для сольюбилизации клеточных мембран и выделения мембранных белков. Перспективной структурной основой для создания мембранотропных АП являются сополимеры стирола и малеиновой кислоты (SMA). Амфифильная анионная структура SMA обеспечивает достаточно специфическое взаимодействие с плазматической мембраной и позволяет изолировать мембранные наноструктуры со связанными белками в нативной форме [2]. Так как коммерчески доступные SMA — дорогостоящие материалы зарубежного производства и их структура постоянно совершенствуется, актуальной задачей представляется синтез аналогов SMA и оптимизация их структуры для выделения мембранных компонентов.

В работе синтезирован ряд образцов SMA методом свободнорадикальной сополимеризации стирола (St) и малеинового ангидрида (МА) в ДМФ в инертной атмосфере с последующим щелочным гидролизом промежуточного продукта [3]. Структуру сополимеров и соотношение мономеров подтверждали методами ИК-Фурье- и ЯМР-спектроскопии. Идентифицированы условия синтеза, позволяющие получать целевые сополимеры с соотношением St : МА в диапазоне от 1 : 1 до 2 : 1. Амфифильные свойства SMA оценивали по критической концентрации мицеллообразования с помощью флуоресцентного зонда.

В качестве модельных биомембран применяли однослойные липосомы, полученные методом гидратации тонкой липидной пленки, со средним гидродинамическим диаметром (ГД) около 100 нм. По данным динамического рассеяния света при использовании SMA (2 : 1) и соотношении SMA : липид 5 : 1 происходило формирование однородных липид-полимерных структур с ГД около 20 нм. Эти наноструктуры были дополнительно визуализированы в индивидуальной форме и охарактеризованы методом атомно-силовой микроскопии. Полученные сополимеры и их производные будут применяться для выделения и анализа пространственной структуры и функциональной активности мембранных белков.

### Литература

1. Perin F. et al. Amphiphilic copolymers in biomedical applications: Synthesis routes and property control // Mater. Sci. Eng., C. Vol. 123 (10). P. 111952.
2. Dörr J. et al. The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research // Eur. Biophys. J. 2016. Vol. 45 (1). P. 3–21.
3. Kumari S. et al. Synthesis and characterization of alkali-modified styrene-maleic anhydride copolymer for dispersion of TiO<sub>2</sub> // J. Appl. Polym. Sci. 2007. Vol. 103 (5). P. 3194–3205.

\* Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00166).

## АНТИМИКРОБНЫЙ ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В АЛЬГИНАТЕ НАТРИЯ\*

М. А. Капустянская<sup>1</sup>, А. Г. Быков<sup>2</sup>, А. Н. Решетилов<sup>2</sup>, С. А. Баскаков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН — обособленное подразделение  
Федерального исследовательского центра «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»

<sup>3</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

✉ graphenox@gmail.com

### Аннотация

Показано ингибирующее влияние иммобилизованных в альгинатном геле наночастиц серебра (NPAg-Alg) на бактериальную культуру. Предполагается, что инертный природный полисахарид альгинат натрия способствует стабильности полученного композита.

Наночастицы серебра (NPAg) рассматриваются как потенциальный источник новых антимикробных агентов. Они имеют широкий спектр активности и значительно меньше способствуют развитию устойчивости [1]. Использованный альгинат может улучшить антимикробную активность широкого спектра действия у NPAg [2]. Поскольку в настоящее время наблюдается рост резистентности микроорганизмов ко всем классам антимикробных препаратов, применяемых в различных сферах человеческой деятельности [3], данное исследование имеет высокую актуальность.

В работе использовали штамм бактерий *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов), относящийся к семейству Acetobacteraceae, который в природе встречается на спелых сладких фруктах, вызывая бактериальную гниль [4].

**Цель данной работы** — исследование возможности применения NPAg-Alg в качестве антимикробного агента, модифицированного природным полисахаридом альгинатом натрия.

### Результаты

При проведении исследования на двух произвольно выбранных партиях NPAg-Alg использована модифицированная методика измерения антибактериальной активности диффузией в агаровый гель [5]. В ходе исследования определена минимальная концентрация композита, проявляющая антимикробную активность. Полученные результаты сведены в таблицу.

**Размер зон угнетения роста бактерий тестируемыми образцами NPAg-Alg**

№	Исследуемый образец	Разведение	Ширина зоны ингибирования роста, мм
1	Alg	–	–
2	NPAg-Alg «1»	–	2–3
3	NPAg-Alg «1»	4-кратное	2–2,5
4	NPAg-Alg «1»	8-кратное	0,5
5	NPAg-Alg «2»	–	1,5–3
6	NPAg-Alg «2»	4-кратное	1,5–3
7	NPAg-Alg «2»	8-кратное	0,5

### Литература

1. Rai M. K., Yadav A. P., Gade A. K. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials // *Biotechnol. Adv.* 2009. Vol. 27. P. 76–82.
2. Green Synthesis of an Alginate-Coated Silver Nanoparticle Shows High Antifungal Activity by Enhancing Its Cell Membrane Penetrating Ability / Xiang S., Ma X., Shi H. et al. // *Appl. Bio Mater.* 2019. Vol. 2. P. 4087–4096.
3. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010. Vol. 74. P. 417–433.
4. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications / A. Gupta, V.K. Singh, G.N. Qazi et al. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001. Vol. 3. P. 445–456.
5. Дмитриева В. С., Семенов С. М. Микробиологический контроль антибиотических препаратов. М.: Медицина, 1965.

\* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания (номер государственной регистрации АААА-А19-119032690060-9).

**GENOME-WIDE SEQUENCING OF THE NOVEL PROBIOTIC STRAIN  
*LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* FCa3L**

O. S. Karaseva, G. D. Ozhegov, F. S. Akhatova, E. A. Anisimova, R. F. Fakhrullin, D. R. Yarullina

*Kazan (Volga Region) Federal University*

✉ olkakar66@gmail.com

**Abstract**

A lot of fermented foods may represent a natural reservoir of new strains of lactobacilli with probiotic properties. Many probiotic isolates are already widely used and produced on an industrial scale. The minimum functional requirements for probiotics include antibiotic resistance, adhesion to epithelial surfaces, and antagonistic activity against intestinal pathogens.

Lactobacilli are widely used in food industry and probiotic therapy because of their preservative properties, antagonistic activity against pathogens and beneficial effects on human health. However, a large number of potentially probiotic strains still need to be explored. The aim was to establish probiotic status of *Lactiplantibacillus plantarum* strain FCa3L by whole-genome sequence analysis and *in vitro* experimental studies.

*L. plantarum* FCa3L was isolated from sauerkraut in 2014. Taxonomic identification was performed using MALDI Biotyper (Bruker, Germany) and 16S rRNA gene sequencing on ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Genomic DNA was sequenced by Illumina MiSeq (Illumina, USA). Genome assembly by the Unicycler v. 0.4.8 gave coliphage phi-X174 and 61 contigs corresponding to a 3.3 million bp scaffold. EggNOG and RAST annotation uncovered multidrug resistance genes and genes encoding synthesis of biotin, thiamine, riboflavin, and vitamin B. No pathogenicity factors have been identified in *L. plantarum* FCa3L genome.

Antagonistic activity of *L. plantarum* FCa3L examined by the agar block test exceeded that of the reference strain *L. plantarum* 8PA3 isolated from the probiotic preparation “Lactobacterin dry” (Biomed, Russia). *L. plantarum* FCa3L was able to inhibit the growth of *Morganella morganii*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The inhibitory effect of *L. plantarum* FCa3L was associated with the acidification of the medium (total titrated acidity was  $1.46 \pm 0.24$  mM/g) and production of hydrogen peroxide.

According to the results of the MATS (microbial adhesion to solvent) method, *L. plantarum* FCa3L had hydrophilic cell surface with basic and electron-donor properties, which corresponded to the low adhesive ability. Yet, FCa3L was significantly more adhesive to the buccal epithelial cells and showed higher cell autoaggregation when compared to the reference strain 8PA3.

Using disc-diffusion method we demonstrated that *L. plantarum* FCa3L bacteria exhibited resistance to vancomycin, ciprofloxacin and aminoglycosides and were sensitive to ampicillin, rifampicin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, and tetracycline.

The work was performed using the equipment of Interdisciplinary Center of Shared Facilities of Kazan Federal University for cellular, genomic and post-genomic research in Volga region and in frames of Russian Government Program of Competitive Development of Kazan Federal University.

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К БОЛЬШОМУ С-КОНЦЕВОМУ ДОМЕНУ ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ТОКСИНА II *BACILLUS CEREUS*\*

А. П. Каратовская<sup>1</sup>, А. В. Замятина<sup>1</sup>, Н. В. Руденко<sup>1</sup>, Ф. А. Бровко<sup>1</sup>,  
А. С. Нагель<sup>2</sup>, Ж. И. Андреева-Ковалевская<sup>2</sup>, А. В. Сиунов<sup>2</sup>, А. С. Солонин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пуцинский филиал Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемакина и Ю. А. Овчинникова РАН

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН — обособленное подразделение  
Федерального исследовательского центра «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»

✉ annakaratovskaya@mail.ru

### Аннотация

В работе описано получение моноклональных антител (МА) к большому С-терминальному домену (НlyIIICTD) гемолизина II (НlyII) *Bacillus cereus*, одному из основных вирулентных факторов бактерии. НlyIIICTD представляет собой надмембранную часть токсина и имеет высокую степень гомологии с другими β-пороформирующими токсинами, к группе которых относится НlyII. Получено два МА, защищающих эритроциты от гемолиза НlyII нескольких штаммов.

*Bacillus cereus* — грамположительная бактерия, вызывающая различные типы инфекций. Одним из факторов вирулентности *B. cereus* является НlyII, который относится к группе β-пороформирующих токсинов и представляет собой гомолог α-токсина *Staphylococcus aureus* с 38%-й идентичностью на уровне аминокислот. НlyII, по сравнению с α-токсином *S. aureus*, имеет С-концевое удлинение из 94 аминокислотных остатков, обозначаемых как СТD (С-терминальный домен). Показано, что СТD способен ориентированно связываться с клеточными мембранами, разрушать макрофаги и Т-клетки, а также олигомеризоваться в присутствии клеточных мембран и образовывать ионные каналы [1].

С целью изучения механизмов порообразования, а также поиска путей подавления гемолиза нейтрализацией НlyII в данной работе получены МА против НlyIIICTD для выявления таких антител, которые способны узнавать и, возможно, подавлять бактериальные β-пороформирующие токсины. В качестве антигена для иммунизации использован НlyIIICTD14579, образованный путем клонирования в плазмидных векторах рTSL и рQE30 и трансформации в *Escherichia coli*.

Однако белок оказался труднорастворимым: по-видимому, при экспрессии в *E. coli* возможные неспецифические гидрофобные взаимодействия приводили к агрегации целевого белка. Для получения растворимой формы НlyIIICTD14579 применялся белок-шаперон SlyD. Целевой белок соединили с SlyD-6his на N-конце через сайт для Тев-протеазы. Белок НlyIIICTD14579 в растворимой форме получали после обработки Тев-протеазой и использовали в качестве антигена для отбора гибридомных клонов, секретирующих специфические МА.

Ранее авторами была создана панель МА против СТD, входящего в НlyIIICTD [2]. Поэтому было необходимо получить МА, которые узнавали бы участок молекулы, отличный от СТD. Для этого иммунные сыворотки характеризовали не только по титру (относительному содержанию антител, специфически связывающихся с антигеном), но и конкурентным иммуноферментным анализом (ИФА) для определения антител, взаимодействующих непосредственно с искомым участком НlyIIICTD. В ходе конкурентного ИФА связывание иммунных сывороток с антигеном в точке, расположенной в линейном диапазоне титрования, ингибировали НlyIIICTD.

Гибридомные клеточные линии, секретирующие МА, получали путем слияния лимфоцитов и миеломной клеточной линии SP2/0 с помощью полиэтиленгликоля. В качестве источника лимфоцитов использовали спленоциты и клетки из подколенных лимфоузлов.

В результате из полученной панели МА два антитела ингибировали гемолиз эритроцитов, вызванный НlyII различных штаммов *Bacillus cereus*.

### Литература

1. Rudenko N., Siunov A., Zamyatina A. et al. The C-terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II oligomerizes by itself in the presence of cell membranes to form ion channels. // Int. J. Biol. Macromol. 2022. Vol. 200. P. 416–427.
2. Руденко Н. В., Каратовская А. П., Замятина А. В. и др. С-терминальный домен гемолитического токсина II *Bacillus cereus* способен взаимодействовать с эритроцитами // Биоорганическая химия. М., 2020. Т. 46, № 3. С. 280–285.

\* Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 22-74-10026).

© А. П. Каратовская, А. В. Замятина, Н. В. Руденко, Ф. А. Бровко, А. С. Нагель, Ж. И. Андреева-Ковалевская, А. В. Сиунов, А. С. Солонин, 2022

## МОДИФИКАЦИЯ КОМПоста, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ МУСОРОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕГО ЗАВОДА

А. Е. Карпенко<sup>1</sup>, В. С. Ржевская<sup>1,2</sup>, Т. М. Минкина<sup>2</sup>, А. В. Омельченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь

<sup>2</sup>Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

✉ alina09kazakova@gmail.com

### Аннотация

В данной работе исследовано влияние биочара и микробного консорциума молочнокислых бактерий и дрожжей на фитостимулирующие свойства компоста, полученного из органических отходов на мусороперерабатывающем заводе. Показано, что и биочар, и микробный консорциум по отдельности снижают ингибирующее действие компоста, а их совместное применение повышает всхожесть семян и стимулирует ростовые процессы растений.

Проблема переработки твердых коммунальных отходов (ТКО) актуальна не только для нашей страны, но и для всего развитого мира. Сортировка и переработка отходов на мусороперерабатывающем заводе (МПЗ) позволяет около 60 % отходов использовать вторично. Часть ТКО в результате естественного биологического разложения органического вещества образует компост, содержащий минеральные и органические вещества. Компост оказывает положительный эффект на растения, однако в действительности отмечено ингибирование ростовых процессов растений.

Цель исследования — подбор технологических приемов обработки компоста, полученного на МПЗ, для дальнейшего использования в качестве органического удобрения.

Материалом исследования служил компост, образованный из органических отходов на одном из МПЗ в Санкт-Петербурге. Для улучшения фитостимулирующих свойств компоста применяли 2 технологических приема: внесение микробного консорциума и биочара. Последний получен из лузги подсолнечника путем пиролиза. Микробный консорциум включал следующие микроорганизмы: *Lactobacillus casei* IMB B-7343, *Lactobacillus plantarum* IMB B-7344, *Lactococcus lactis* IMB B-7352, *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5046, *Trichoderma asperellum*.

В компост из органических отходов вносили биочар в количестве 10 г на 1 кг компоста, микробный консорциум — 1 мл/кг. Оба технологических приема использовали как по отдельности, так и совместно. Влажность субстрата доводили до 70 % и выдерживали его в течение 4 мес. В качестве тест-объектов применяли семена ржи сорта Марусенька и гороха сорта Мадонна. Всхожесть семян учитывали на 14-е сутки, длину надземной части растений — на 28-е сутки.

В результате проведенных исследований показано, что компост, полученный на МПЗ, полностью ингибировал прорастание семян гороха. 48 % семян ржи проросло с задержкой на 2 недели по сравнению с почвой, используемой в качестве контроля. Таким образом, компост, полученный на МПЗ, ингибирует прорастание семян и ростовые процессы растений.

Использование изучаемых технологических приемов продемонстрировало, что и микробный консорциум, и биочар повысили всхожесть семян ржи по сравнению с контролем (компост, полученный на МПЗ) на 15–59 %, а гороха — до 50 %.

При обработке почвы микробным консорциумом отмечено увеличение длины надземной части ржи сорта Марусенька на 14,9 % по сравнению с контролем, а при внесении биочара — на 22,0 %. Совместное использование биочара и консорциума микроорганизмов стимулировало рост надземной части ржи сорта Марусенька на 51,1 % по сравнению с контролем.

В результате проведенных исследований показано, что и биочар, и микробный консорциум стимулируют ростовые процессы растений гороха сорта Мадонна в равной мере. Так, обработка компоста микробным консорциумом стимулировала длину надземной части растений на 50,0 %, а биочаром — на 52,9 % по сравнению с контролем. Совместное использование двух технологических приемов стимулировало длину надземной части гороха сорта Мадонна в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, и микробный консорциум, и биочар снижают ингибирующее действие компоста, полученного на МПЗ, а их комплексное внесение стимулирует ростовые процессы растений.

### Литература

1. Черданцева Е. С., Гаврилова О. В. Использование микроорганизмов при утилизации промышленных и бытовых отходов // Науч.-исслед. публикации. 2016. № 1 (33). С. 66–69.
2. Kookana R. S. The role of biochar in modifying the environmental fate, bioavailability, and efficacy of pesticides in soils: A review. // Aust. J. Soil Res. 2010. Vol. 48. P. 627–637.



## РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ

А. Д. Кириченко<sup>1</sup>, Е. А. Брюшкова<sup>2</sup>, А. С. Долгова<sup>1</sup>, В. Г. Дедков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

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

✉ kirichenko@pasteurorg.ru

### Аннотация

В странах Азии вирус *Nipah* (NiV) представляет значительную угрозу для людей и животных. Современная диагностика проводится методом ПЦР в режиме реального времени или методом ИФА. Обе технологии трудоемки и требуют применения дорогостоящего стационарного оборудования. Возникает потребность в разработке простых, быстрых и точных тест-систем для выявления вирусов в полевых условиях.

Вирус NiV (семейство Paramyxoviridae, род *Henipavirus*) впервые был обнаружен в 1999 г. после вспышки неизвестного заболевания среди свиней и людей в Малайзии и Сингапуре. Смертность среди населения составила около 30 %, при этом более 1 млн свиней было убито, чтобы удержать вспышку под контролем [1]. Симптомы заражения вирусом NiV варьируются от легких до угрожающих жизни, специфического лечения не существует. В Азии, особенно в Бангладеш и Индии, вспышки заражения NiV регистрируются практически ежегодно (с 1998 по 2018 г.), смерть наступает у 40–70 % инфицированных, преимущественно из-за развития энцефалита [2]. Поэтому NiV был выбран в данной работе в качестве модели для создания тест-системы на основе дезоксирибозимов (Dz) для экспресс-диагностики вирусов рода *Henipavirus*.

Dz — короткие синтетические ДНК-олигонуклеотиды, катализирующие расщепление фосфодиэфирной связи между нуклеотидами в присутствии двухвалентных ионов металлов. Выбранный нами Dz 10-23 хорошо изучен и имеет высокую каталитическую активность [3]. Биосенсор разделен на два фрагмента по принципу бинарной пробы (Dz1 и Dz2), которые состоят из участков связывания целевой РНК, флуоресцентного субстрата (Fsub) и половины последовательности каталитического центра Dz 10-23 (рис. 1).

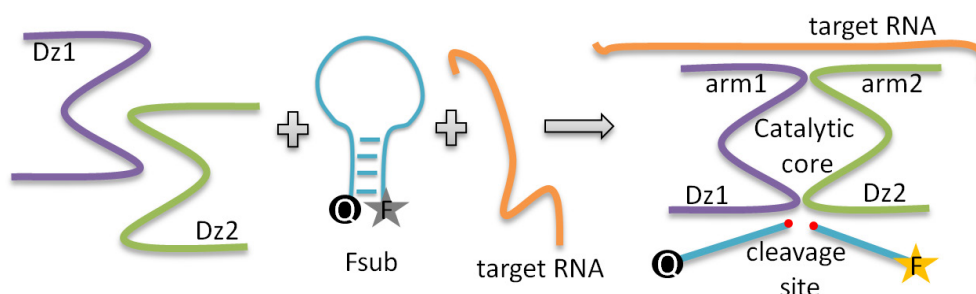


Рис. 1. Детекция целевой РНК при помощи бинарной пробы

Сборка активного центра Dz 10-23 с последующим расщеплением Fsub и регистрацией флуоресцентного сигнала возможна только в присутствии в образце целевой РНК.

Разработанный нами ДНК-наноробот Dz\_NiV требует преинкубации в буфере для сборки (5 мин, 95 °С), после чего может храниться при –20 °С, а однократная заморозка/оттаивание не влияет на его каталитическую активность. Для оценки диагностического потенциала биосенсора измерена флуоресценция FAM в растворе, содержащем синтетическую РНК длиной 35 нуклеотидов (nip35), соответствующую таргентной последовательности NiV, Fsub, меченный парой FAM-BHQ1 и Dz\_NiV. В качестве контроля использовалась смесь Dz\_NiV и Fsub. Предел обнаружения целевой РНК достигал 5 нМ, время развития сигнала составляло 30 мин при температуре 37 °С (рис. 2, А).

Специфичность Dz\_NiV оценивали в присутствии синтетических РНК шести других РНК-вирусов аналогичной длины: *Hendra*, *Machupo*, *Sabia*, *Junin*, *Guanarito* и SARS-CoV. Флуоресцентный сигнал был зафиксирован только при наличии в реакционной смеси nip35 (рис. 2, В).

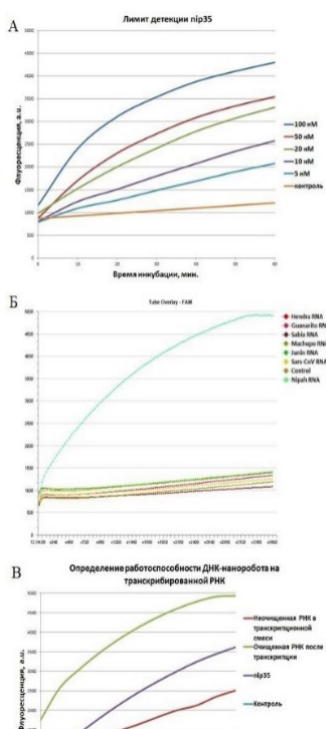


Рис. 2. *A* — предел обнаружения pir35; *B* — оценка специфичности Dz\_NiV, изображение с флуориметра T16-ISO Instrument Axxin; *B* — активность Dz\_NiV после транскрипции РНК

Вторичная структура полноразмерной РНК может препятствовать взаимодействию с биосенсором. Работоспособность Dz\_NiV на длинном фрагменте проверяли с помощью плазмиды с заклонированной таргетной последовательностью. Участок около 700 п. н. амплифицирован при помощи ПЦР, после чего осуществлялась транскрипция. Флуоресцентный сигнал оценивали после очистки РНК или без (рис. 2, *B*) в присутствии Fsub и Dz\_NiV. Детекция возможна для неочищенного продукта транскрипции, что позволяет пропустить этот шаг при создании тест-системы.

Разработана модель высокоспецифичного биосенсора Dz\_NiV для детекции РНК вируса NiV с пределом чувствительности 5 нМ при 37 °С. Планируется проведение исследования на полноразмерной РНК NiV и оптимизация условий для ускорения диагностики NiV в полевых условиях.

### Литература

1. Chua K. B. et al. Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus // *Sci.* 2000. Vol. 288 (5470). P. 1432–1435.
2. Ang B. S. P. et al. Nipah Virus Infection // *J. Clin. Microbiol.* 2018. Vol. 56 (6). e01875–17.
3. Ma L., Liu J. Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology // *iScience.* 2020. Vol. 23 (1). 100815.

## PREPARATION OF *E. COLI* MEMBRANE FRACTION CONTAINING ACTIVE (P450) FORM OF HUMAN CYP2B6

M. S. Kisel, A. V. Svirid, A. A. Gilep

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*

✉ marusen.kee@gmail.com

### Abstract

Our study presents a technique to obtaining an active form of recombinant human CYP2B6, stabilized by the incorporation into the membrane fraction of *E. coli* (bactosomes).

The preparative production of hydroxylated metabolites of steroid compounds as analytical standards for their efficient, fast, and reliable doping control, as well as for the preparation of pharmaceutical substances, is of high importance. Cytochrome P450 (CYP) superfamily monooxygenases act as promising biocatalysts for steroid hydroxylation due to high regio- and stereoselectivity, which is difficult to achieve by chemical synthesis methods.

The aim of our work was to obtain a stable form of CYP2B6, since this enzyme is considered for targeted 16 $\alpha$ - and 16 $\beta$ -hydroxylation of testosterone [1] for doping control purposes.

Co-expression of CYP2B6 modified forms with GroEL/ES chaperones was carried out in *E. coli* DH5 $\alpha$  cells. Wild-type human CYP2B6 cDNA sequence with alternative variants of the N-terminal part was cloned into expression vectors: full-length CYP2B6 cDNA with the replacement of amino acid residues M<sub>1</sub>ELSVLL<sub>7</sub> with M<sub>1</sub>ALLLAV<sub>7</sub> (pCW-CYP2B6FL-WT), truncated CYP2B6 cDNA with the replacement of amino acids 1–29 with M<sub>1</sub>AKKTR<sub>6</sub> (pTRC99a-CYP2B6d01-WT) and M<sub>1</sub>AKKTSSK GK<sub>10</sub> (pTRC99a-CYP2B6d02-WT). In the preparation obtained after double-step purification of all variants of recombinant C-His<sub>6</sub> tagged CYP2B6, significant aggregation was observed.

To improve the stability of CYP2B6 in aqueous solutions, amino acid substitutions Y226H and K262R were introduced, which increase the level of expression, solubility, and thermal stability of the protein [2]. During the protein purification process, a significant decrease in aggregation was observed. However, the reduced carbon-monoxide difference spectrum of the purified recombinant CYP2B6 showed a single absorption maximum at 420 nm, which indicates the presence of only the inactive P420 form of the enzyme in the solution. Therefore we attempted to obtain membrane bounded form of CYP2B6 without additional purification steps.

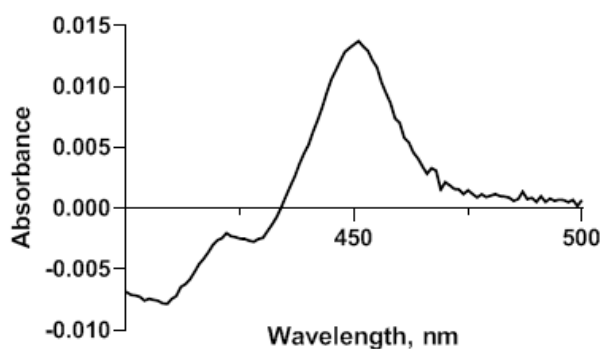
The membrane fraction (bactosomes) was obtained from *E. coli* DH5 $\alpha$  cells expressing CYP2B6 (CYP2B6FL-WT, CYP2B6FL-Y226H/K262R and CYP2B6d02-Y226H/K262R variants) using sequential steps of ultrasonic cell disruption, centrifugation and membrane fraction resuspension.

The CYP content in bactosomes was measured spectrophotometrically at 450 nm after the addition of sodium dithionite and flushing with carbon monoxide.

Estimation of the hydrodynamic radius and particle size distribution in the preparation was carried out using dynamic laser light scattering (DLS) measurements on DynaPro NanoStar instrument (Wyatt Technology Corp.) at 25 °C for 10 acquisitions of 5 s.

Only bactosomes containing truncated CYP2B6 Y226H/K262R double mutant had pronounced peak at 450 nm that indicates the presence of catalytically active form of CYP (figure). It was not possible to record the spectra of other CYP2B6 variants in bactosomes. Also, CYP2B6 Y226H/K262R bactosomes had a monomodal distribution of the hydrodynamic radius (the average particle radius was estimated to be 210 nm), and was constant during the storage at –20 °C for a week. Thus, we were able to obtain a membrane fraction containing only one genetic variant of CYP2B6 — the Y226H/K262R double mutant with the replacement of amino acids 1–29 with the sequence M<sub>1</sub>AKKTSSK GK<sub>10</sub>.

In conclusion, a technique to obtaining an active form of recombinant human CYP2B6 incorporat-



CO-difference spectrum of truncated CYP2B6 Y226H/K262R mutant reduced with sodium dithionite in bactosomes

ed into the membrane fraction (bactosomes) of *E. coli* has been developed. This helped to obtain an active and stabilized form of the enzyme that can later be used to perform the hydroxylase activity with respect to steroidal substrates including testosterone.

#### References

1. Niwa T. et al. Regioselective hydroxylation of steroid hormones by human cytochromes P450 // Drug Metab. Rev. 2015. Vol. 47, № 2. P. 89–110.
2. Gay S. C. et al. Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-Å resolution // Mol. Pharmacol. 2010. Vol. 77, № 4. P. 529–538.

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ *PARACOCCUS YEEI* ВКМ В-3302 КАК ОСНОВЫ РЕЦЕПТОРНОГО ЭЛЕМЕНТА БПК-БИОСЕНСОРА \*

Т. Н. Козлова, Н. Ю. Юдина

*Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии,  
Научно-исследовательский центр «БиоХимТех», Тульский государственный университет*

✉ kozlovatatyana\_1993@mail.ru

### Аннотация

При сравнении характеристик БПК-биосенсора на основе лиофилизированных и ранее подверженных замораживанию бактерий *P. yeei* В-3302 установлено, что процесс сублимационной сушки не оказывает значительного влияния на окислительную активность биоматериала. Таким образом, клетки после вакуумной сушки можно применять в качестве биоматериала для БПК-биосенсора, а их использование в такой форме повысит удобство в формировании рецепторного элемента.

В промышленности непрерывный мониторинг степени органического загрязнения сточных вод необходим для соблюдения нормативных требований. Биохимическое потребление кислорода (БПК) — важный параметр, используемый для проверки качества воды. Поскольку стандартный метод определения БПК<sub>5</sub> — это длительный процесс, который не подходит для онлайн-мониторинга, целесообразно применение нового подхода экспресс-оценки данного показателя с помощью БПК-биосенсоров.

Для точности измерения БПК<sub>5</sub> в биосенсорах используют монокультуры целых клеток микроорганизмов, обладающих полиферментативной системой, способной катаболизировать широкий спектр субстратов. При замораживании биоматериала для формирования биораспознающих элементов биосенсоров при температуре ниже точки кристаллизации воды значительно сокращается выживаемость и срок хранения микроорганизмов вследствие высокого внутриклеточного осмотического давления.

С целью получения транспортабельных и устойчивых к хранению биоконцентратов культуры клеток подвергают сублимационной сушке, в процессе которой на них действуют стрессовые условия (замораживание, вакуумирование, низкая активность воды), вызывающие необратимые повреждения клеток. Известно, что у микроорганизмов, находящихся длительное время в состоянии стресса, изменяются физиолого-биохимические свойства, что приводит к повышению или ингибированию метаболической активности [1]. Применение микроорганизмов в лиофилизированной форме в качестве основы биораспознающего элемента БПК-биосенсора может позволить увеличить стабильность работы сенсора, а сухая форма биопрепарата повысит удобство в использовании и формировании рецепторного элемента. Поэтому цель этого исследования — оценка влияния сублимационной сушки на характеристики амперометрического БПК-биосенсора на основе лиофилизированных бактерий *P. yeei*.

Биосенсорные измерения проводили с использованием анализатора БПК-термооксиметра «ЭКСПЕРТ-009» с кислородным электродом и лиофилизированными бактериями *P. yeei*, иммобилизованными в диализную мембрану (Sigma-Aldrich, США). На основе высушенных микроорганизмов сформирован биочувствительный элемент БПК-биосенсора и измерены его характеристики (см. таблицу).

### Характеристики БПК-биосенсоров на основе бактерий *P. yeei*

Характеристики	Форма биоматериала рецепторного элемента	
	Лиофилизированная форма бактерий	Подверженные замораживанию бактерии [2]
Коэффициент чувствительности, с <sup>-1</sup> ·10 <sup>-5</sup>	100 ± 6	110 ± 5
Нижняя граница определяемых содержаний, мг/дм <sup>3</sup>	0,49	0,6
Диапазон определения БПК <sub>5</sub> , мг/дм <sup>3</sup>	0,49–44	0,6–350
Операционная стабильность (15 измерений), %	4,4	8,35
Долговременная стабильность, сутки	12	20
Экспрессность (время единичного анализа), мин	5–7	6–8
Время хранения бактерий, месяц	более 18	2

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Сформированный БПК-биосенсор на основе бактерий *P. yeii* в лиофилизированной форме не уступает по чувствительности биосенсору на основе тех же микроорганизмов, ранее подверженных замораживанию, однако характеризуется более низкой нижней границей определяемых содержаний БПК<sub>5</sub>, более узким диапазоном определяемых концентраций БПК<sub>5</sub> и высокой сходимостью ответов биосенсора, что может свидетельствовать о незначительном влиянии процесса лиофилизации на окислительную активность клеток и повышении стабильности работы сенсора в результате действия стрессовых факторов.

#### **Литература**

1. Zhang V., Burkhardt D. H., Rouskin S. et al. A Stress Response that Monitors and Regulates mRNA Structure Is Central to Cold Shock Adaptation // Mol. Cell. 2018. Vol. 70. P. 274–286.
2. Абрамова Т. Н., Козлова Т. Н., Юдина Н. Ю. Субстратная специфичность бактерий *Paracoccus yeii*, выделенных из активного ила // Экотоксикология-2016. Материалы Всерос. конф. с элементами науч. школы для молодежи. Тула: Тул. гос. ун-т. 2016. С. 19–21.

**АНАЛИЗ ГИСТОН- И ОБМ-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ АКТИВНОСТЕЙ sIgA МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА\***

И. Ю. Компанеец, Г. А. Невинский

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

✉ kompaneecevan@mail.ru

**Аннотация**

В работе впервые проанализированы активности sIgA грудного молока в реакциях гидролиза ОБМ (основного белка миелина) и пяти гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Показано, что молочные иммуноглобулины класса А эффективно гидролизуют основной белок миелина, смесь гистонов и индивидуальные препараты гистонов. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии проанализированы сайты гидролиза этих субстратов и обнаружена каталитическая перекрестная реактивность гидролиза основного белка миелина и гистонов антителами sIgA против ОБМ и sIgA против гистонов.

Иммуноглобулины молока обеспечивают защиту желудочно-кишечного тракта новорожденных от бактериальных и вирусных инфекций. Молоко содержит иммуноглобулины, обладающие многими каталитическими свойствами: протеазной, фосфатазной, ДНКазной, РНКазной и др.

Специфические для разных субстратов классические ферменты обычно катализируют только одну химическую реакцию. Абзимы против разных белков обычно могут расщеплять только свои специфические белки. Однако существуют примеры абзимов с каталитической перекрестной реактивностью. Первыми примерами таких каталитически активных антител являются анти-ОБМ IgG и антитела против гистонов Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4 из сывороток ВИЧ-инфицированных пациентов. Проанализирована возможная ферментативная перекрестная реактивность абзимов sIgA молока против гистонов и ОБМ.

Показано, что молочные sIgA эффективно гидролизуют основной белок миелина и гистоны. С помощью жестких критериев доказано, что гидролиз осуществляют иммуноглобулины, а не возможные совыделяющиеся ферменты. Один из критериев, доказывающих, что протеазная активность принадлежит sIgA, — совпадение профилей гель-фильтрации смеси sIgA в кислых условиях («кислый шок»: при pH 2,6 происходит разрушение всех комплексов) с профилем каталитической активности полученных на гель-фильтрации фракций. На профиле гель-фильтрации отсутствуют пики других белков, а каталитическая активность определяется только во фракциях sIgA.

Для исследования каталитической перекрестной реактивности молочных sIgA из исходных поликлональных препаратов sIgA с помощью серий аффинных хроматографий на ОБМ- и гистон-сефарозе получили препараты sIgA против ОБМ и sIgA против смеси из пяти гистонов. Затем препараты анти-ОБМ и антигистон-sIgA исследовали в реакции гидролиза ОБМ и индивидуальных препаратов гистонов. С помощью MALDI масс-спектрометрии определены сайты гидролиза исследуемых субстратов. В ходе эксперимента обнаружено, что анти-ОБМ sIgA гидролизуют препараты гистонов, а антигистоновые антитела — ОБМ. Сайты гидролиза гистонов и ОБМ находятся в разных, но в высоко гомологичных сайтах этих белков.

Таким образом, полученные гомогенные антигистон и анти-ОБМ фракции sIgA демонстрируют не только перекрестное комплексообразование, но и каталитическую перекрестную реактивность при гидролизе ОБМ и гистонов.

\* Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-15-00103).  
© И. Ю. Компанеец, Г. А. Невинский, 2022

## ПОЛУЧЕНИЕ УКОРОЧЕННЫХ АНАЛОГОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АЦИДОЦИНА А ИЗ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*\*

Д. В. Кононова<sup>1,2</sup>, Д. В. Антошина<sup>2</sup>, Т. В. Овчинникова<sup>1,2</sup>, С. В. Баландин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ arenicin@mail.ru

### Аннотация

Бактериоцины подкласса IIa привлекают внимание в качестве моделей для разработки антимикробных лекарственных средств нового поколения. Данная работа посвящена структурно-функциональному исследованию ацидоцина А — представителя подкласса, имеющего необычный спектр активности и структурные особенности, отличающие его от большинства родственных пептидов. Получен ряд укороченных аналогов ацидоцина А и протестирована их антимикробная активность.

Антимикробные пептиды из разных природных источников рассматриваются в качестве альтернативы традиционным противомикробным лекарственным средствам. К соединениям этого класса относятся, в частности, бактериоцины — пептиды, вырабатываемые бактериями в ходе межвидовой борьбы. Благодаря способности подавлять рост гнилостных и патогенных микроорганизмов некоторые бактериоцины используются как консерванты в пищевой промышленности. В связи с распространением резистентности патогенов к традиционным антибиотикам в настоящее время исследуется возможность применения этих веществ в медицине и ветеринарии.

Данная работа посвящена исследованию ацидоцина А — нетипичного представителя бактериоцинов подкласса IIa (педиоцин-подобные бактериоцины). Характерная структурная особенность пептидов указанной группы — аминокислотная последовательность YGNG(V/L) в N-концевой части молекулы (педиоциновый бокс). Спектр активности ацидоцина А отличается от активности подавляющего большинства педиоцин-подобных бактериоцинов, что делает его интересным объектом для исследования. Данная работа стала продолжением структурно-функционального исследования ацидоцина А и заключалась в получении и тестировании ряда укороченных рекомбинантных аналогов, в том числе лишенных педиоцинового бокса. Известно, что этот консервативный участок критически важен для функционирования классических педиоцин-подобных пептидов. Ранее нами было показано, что в случае ацидоцина А мутагенез педиоцинового бокса и даже полное его удаление приводят лишь к частичной потере антимикробных свойств. Следующей задачей стал поиск ключевых участков молекулы, обеспечивающих ее функциональную активность. При проектировании укороченных аналогов предпочтение отдавалось вариантам, сохраняющим высокий положительный заряд молекулы, а также дисульфидную связь, присутствующую в полноразмерном ацидоцине А.

Плазмидная конструкция для экспрессии гена ацидоцина А была подвергнута направленному мутагенезу с удалением фрагментов кодирующей последовательности. Рекомбинантные пептиды получены путем гетерологической экспрессии в *E. coli* BL21 (DE3) и очищены с помощью металлохелатной хроматографии и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Тестирование антимикробной активности проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде на панели штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Результаты тестов показали различный характер изменения профиля активности у разных укороченных вариантов пептида.

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00369.

© Д. В. Кононова, Д. В. Антошина, Т. В. Овчинникова, С. В. Баландин, 2022



## ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ E И NS1 ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ IgG

Е. И. Кривошеина<sup>1</sup>, М. Ю. Карташов<sup>1,2</sup>, Н. Д. Ушкаленко<sup>1</sup>,  
Е. В. Найденова<sup>3</sup>, С. А. Пьянков<sup>1</sup>, В. А. Терновой<sup>1</sup>, В. Б. Локтев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово  
<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup>Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

✉ katr962@mail.ru

### Аннотация

В данной работе получены бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных белков E и NS1 ВЖЛ, содержащие эпитопы к вирусу, и выделены очищенные антигены. Подтверждена специфичность рекомбинантных белков к антителам IgG ВЖЛ. Проведено сравнение экспериментальных вариантов ИФА тест-систем на основе рекомбинантных белков E и NS1 с существующими коммерческими тест-системами ИФА, направленными на выявление антител IgG к различным флавивирусам.

Желтая лихорадка (ЖЛ) остается одной из самых распространенных природно-очаговых инфекционных болезней в мире. В связи с возрастающим туристическим потоком в страны, эндемичные по ЖЛ, обнаружением на территории южных регионов России устойчивых популяций комаров видов *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, являющихся основными переносчиками вируса желтой лихорадки (ВЖЛ), и тем фактом, что в медицинских учреждениях нашей страны можно получить живую аттенуированную вакцину против ЖЛ, но нет возможности оценки эффективности вакцинации, возникает вопрос о разработке и внедрении в практику диагностических наборов для выявления антител к возбудителю методом иммуноферментного анализа (ИФА).

**Цель данной работы** — получение рекомбинантных E и NS1 белков ВЖЛ и оценка их диагностической значимости для дифференциальной диагностики ЖЛ.

В работе выделены гибридные плазмиды pET160-E3 и pET200-NS1, содержащие фрагменты генов белков E и NS1 в бактериальной системе *E. coli*. Трансформированные гибридными плазмидами клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) обеспечивали получение рекомбинантных белков E и NS1.

Для определения специфичности взаимодействия полученного рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ проведен ряд экспериментов с использованием анализа вестерн-блот и ИФА.

Исследование очищенных E и NS1 белков ВЖЛ, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, в анализе вестерн-блот показало специфичное взаимодействие образца сыворотки крови, содержащей антитела к ВЖЛ, с рекомбинантными антигенами ВЖЛ.

Для подтверждения специфичного взаимодействия полученного рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ сформировали панель сывороток крови от людей, иммунизированных против ВЖЛ, — 20 шт., а также от людей, не имевших антител к ВЖЛ и ВКЭ, — 10 шт. При тестировании этих сывороток в ИФА происходит специфичное связывание антител к ВЖЛ с рекомбинантными белками.

Далее, для оценки перспектив использования полученных рекомбинантных антигенов необходимо было проверить его сероконверсию с другими представителями флавивирусов. Для этого во время работы на базе МК СПЭБ в Гвинейской Республике в 2021–2022 гг. сформировали панель образцов из 250 сывороток крови людей с неизвестным иммунным статусом в отношении ВЖЛ, вирусов лихорадки денге (ВЛД), вируса Западного Нила (ВЗН) и вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). При тестировании сывороток выявлено 43,2 % положительных проб при использовании NS1 и 34,8 % с применением E белка. Положительные пробы дополнительно протестированы коммерческими тест-системами ИФА, направленными на выявление IgG к ВЛД, ВЗН и ВКЭ. В серии экспериментов показан высокий уровень сероконверсии между экспериментальной тест-системой ИФА на основе рекомбинантного NS1 белка ВЖЛ и коммерческими тест-системами ИФА на вышеперечисленные флавивирусы.

### Заключение

В данной работе получены бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных белков E и NS1 ВЖЛ, содержащие эпитопы к вирусу, и выделен очищенный антиген. Подтверждена специфичность этих рекомбинантных антигенов в отношении антител IgG к ВЖЛ. Проведено сравнение экспериментальной тест-систем с тремя коммерческими наборами на выявление антител IgG к ВЛД, ВЗН и ВКЭ. Показан достаточно высокий уровень сероконверсии между тремя зарегистрированными тест-системами на обнаружение IgG к ВЛД, ВЗН, ВКЭ и экспериментальным вариантом тест-системы на основе рекомбинантного белка NS1 ВЖЛ. При этом полученный рекомбинантный E белок ВЖЛ не имеет перекрестных иммунных реакций с другими флавивирусами. Такой белок можно использовать для дифференциальной иммунодиагностики с целью выявления антител к ВЖЛ.

## ПОИСК НОВЫХ АНТИСЕПТИКОВ НА ОСНОВЕ 3'-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ N<sup>4</sup>-АЛКИЛ-5-МЕТИЛ-2', 3'-ДИДЕЗОКСИЦИТИДИНОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОБЪЕКТОВ КУЛЬТУРНОГО НАСЛЕДИЯ ИЗ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕИ\*

В. И. Кукушкина<sup>1,2</sup>, Л. А. Александрова<sup>3</sup>, Д. А. Макаров<sup>3</sup>, Д. А. Авданина<sup>2</sup>, А. А. Жгун<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

<sup>2</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

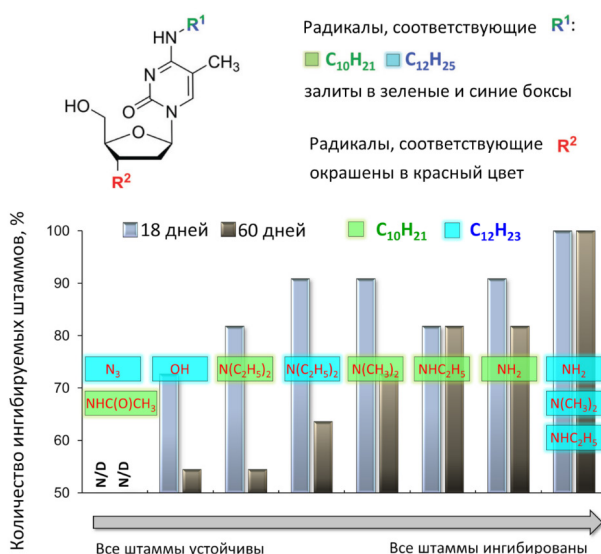
✉ kucku.vera2011@yandex.ru

### Аннотация

Микроорганизмы — один из основных факторов, приводящих к разрушению объектов культурного наследия, в частности произведений живописи. В связи с этим актуальной задачей является поиск новых соединений, защищающих произведения от биопоражения и не взаимодействующих с живописными материалами.

В данной работе изучена противогрибковая активность новых соединений, N<sup>4</sup>-модифицированных цитидинов, и азидотимидина в качестве положительного контроля на агаризованной среде Чапека — Докса для 11 представителей мицелиальных грибов-деструкторов темперной живописи. Эти микроорганизмы ранее изолировали от экспонатов и поверхностей залов древнерусской живописи основного исторического здания Государственной Третьяковской галереи (ГТГ) [1]. Также ранее показано, что они являются деструкторами изобразительных материалов и доминантными представителями микробиома ГТГ: пять видов из родов *Aspergillus* (STG-25G, STG-57, STG-86, STG-93W и STG-106), два штамма *Cladosporium* (STG-52B и STG-93B), а также штаммы *Ulocladium* (STG-36), *Simplicium* (STG-96), *Microascus* (STG-103) и *Penicillium* (STG-117). Недавно большинство этих штаммов протестировали на чувствительность к хитозану [2] и ряду N<sup>4</sup>-алкильных производных 5-метил-2'-дезоксцитидинов [3].

С целью дальнейшей разработки биоцидов нового поколения с широким спектром действия, способных подавлять рост грибов-деструкторов темперной живописи в ГТГ, синтезирован набор новых 3'-модифицированных производных N<sup>4</sup>-алкил-5-метил-2', 3'-дидезоксицитидинов. Для этого в нашей работе проведена замена 3'-гидроксильной группы на аминогруппу, аминоэтиловые и диалкиламиногруппы. Это привело к значительному усилению противогрибковой активности, в первую очередь к роду *Aspergillus* [4]. Несколько новых соединений смогли полностью ингибировать рост всех тестируемых форм (0,7 мМ), выделенных из произведений искусства в ГТГ. Наибольшую активность проявили 3'-амино-N<sup>4</sup>-додецил-2',3'-дидезокси-5-метилцитидин и его алкилированные производные (см. рисунок).



Процент полностью ингибированных штаммов среди 11 тест-культур, изолированных в Государственной Третьяковской галереи, через 18 и 60 дней после инокуляции. N/D — не обнаружено

\* Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00094).  
 © В. И. Кукушкина, Л. А. Александрова, Д. А. Макаров, Д. А. Авданина, А. А. Жгун, 2022

Таким образом, такие соединения (3'-модифицированных производных N<sup>4</sup>-алкил-5-метил-2', 3'-дидезоксицитидинов) перспективны для использования в качестве биоцидов для защиты произведений искусства от плесневых грибов.

#### **Литература**

1. Zhgun A. A. et al. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. Public Library Sci. (PLoS). 2020. Vol. 15, № 4. P. e0230591.
2. Zhgun A. A. et al. Search for Efficient Chitosan-Based Fungicides to Protect the 15<sup>th</sup>–16<sup>th</sup> Centuries Tempera Painting in Exhibits from the State Tretyakov Gallery // Microbiol. 2020. Vol. 89, № 6. P. 750–755.
3. Alexandrova L. A. et al. Discovery of novel N4-alkylcytidines as promising antimicrobial agents // Eur. J. Med. Chem. Elsevier Masson. 2021. P. 113212.
4. Alexandrova L. A. et al. 3'-Amino modifications enhance the antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides // New J. Chem. R. Soc. Chem. 2022. Vol. 46, № 12. P. 5614–5626.

## СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ *SILENE BACCIFERA* (L.) ROTH

М. В. Кулаков, Л. О. Ларцева, А. В. Пунгин

Высшая школа живых систем образовательно-научного кластера  
«Институт медицины и наук о жизни ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта»»

✉ zarich36@mail.ru

### Аннотация

Волдырник ягодный (*Silene baccifera* (L.) Roth) — редкий вид, локально распространенный на территории Калининградской области. В растении содержится широкий комплекс биологически активных соединений, таких как гиперозид, галловая кислота (ГК), хлорогеновая кислота (ХГК) и фитостероиды, которые проявляют фармако-терапевтическое действие, что является основанием для использования *S. baccifera* для нужд фармацевтической промышленности.

Спрос на лекарственные вещества из растений увеличивается с каждым годом, однако из-за ряда ограничений этот процесс является дорогостоящим. В настоящее время получение клеточных и тканевых культур как источник биологически активных веществ (БАВ) — одно из перспективных направлений в биотехнологии растений. Цель работы — изучение суммарного содержания фенольных соединений (ФС), флавоноидов, флавонолов, гидроксикоричных кислот (ГКК), танинов и антиоксидантной активности экстрактов листьев, корней, стеблей и соцветий *S. baccifera*.

Для получения экстрактов в пробирки на 50 мл переносили 0,5 г сухого гомогенизированного растительного материала и добавляли 40 мл 60 % метанола, после чего проводили мацерацию в течение 3 ч на орбитальном шейкере ELM1 S-3M.A10 при 210 об/мин. Далее центрифугировали (Eppendorf 5810R) в течение 30 мин при 3900 g. Супернатант переливали в мерную колбу на 50 мл и доводили объем 60 % метанолом до метки. Для определения БАВ использовались спектрофотометрические методы (спектрофотометр Shimadzu UV-3600). Суммарное содержание ФС анализировали с помощью реактива Фолина — Чокальтеу; флавоноидов — методом с применением 5%-го раствора нитрата натрия и хлорида алюминия; флавонолов — методом, основанным на реакции комплексообразования с хлоридом алюминия при добавлении 10%-го раствора уксусной кислоты. Содержание ГКК в экстрактах определялось с использованием реагента Арно. Суммарное содержание танинов рассчитывалось в два этапа с осаждением танинов желатином и каолином. Антиоксидантную активность (АОА) экстрактов изучали методом DPPH (2,2- дифенил-1-пикрилгидразил). Оценка значимости различий проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки ( $p = 0,05$ ).

В результате анализа ANOVA с критерием Тьюки установлено наличие статистически значимых различий в суммарном содержании ФС, флавоноидов, флавонолов, танинов, ГКК и АОА между экстрактами листьев, корней, стеблей и соцветий *S. baccifera* ( $p \leq 0,05$ ).

Наибольшее среднее содержание ФС отмечено в экстрактах листьев ( $7,2 \pm 2,4$  мг-экв. ГК/г), а наименьшее — в экстрактах корней ( $1,1 \pm 0,2$  мг-экв. ГК/г), см. рисунок, А.

Наибольшее содержание флавоноидов определено в экстрактах листьев ( $8,2 \pm 3,5$  мг-экв. рутина/г), наименьшее — в экстрактах корней ( $0,5 \pm 0,3$  мг-экв. рутина/г), см. рисунок, Б.

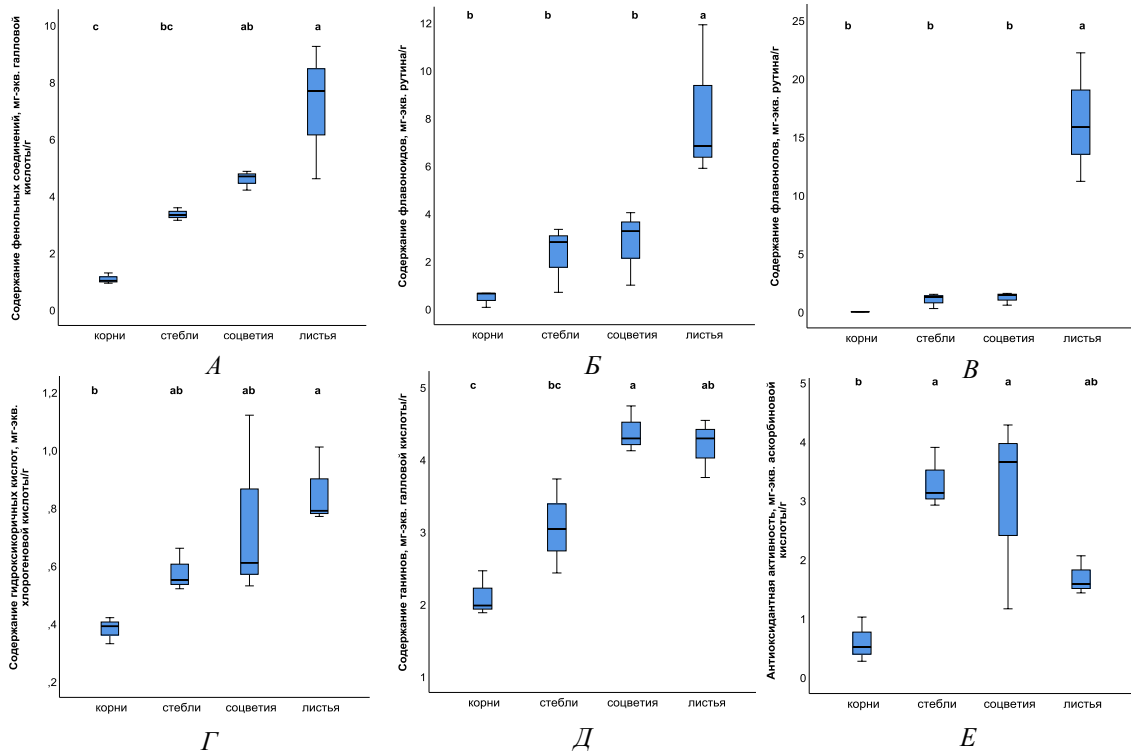
Наибольшее содержание флавонолов выявлено в экстрактах листьев ( $16,4 \pm 5,5$  мг-экв. рутина/г). В экстрактах корней флавонолы не обнаружены (см. рисунок, В).

Наибольшее среднее содержание ГКК обнаружено в экстрактах листьев ( $0,9 \pm 0,1$  мг-экв. ХГК/г), а наименьшее — в экстрактах корней ( $0,4 \pm 0,05$  мг-экв. ХГК/г), см. рисунок, Г.

Наибольшее среднее содержание танинов установлено в экстрактах соцветий ( $4,4 \pm 0,3$  мг-экв. ГК/г), а наименьшее — в экстрактах корней ( $2,1 \pm 0,3$  мг-экв. ГК/г), см. рисунок, Д.

Наибольшую среднюю АОА проявляют экстракты стеблей ( $3,3 \pm 0,5$  мг-экв. аскорбиновой кислоты/г), а наименьшую — экстракты корней ( $0,6 \pm 0,4$  мг-экв. аскорбиновой кислоты/г), см. рисунок, Е.

Таким образом, анализы БАВ и АОА *S. baccifera* показали, что наибольшее содержание ФС, флавоноидов, флавонолов и ГКК обнаружено в экстрактах листьев. Наибольшее содержание танинов определено в экстрактах соцветий, а наибольшую АОА демонстрируют экстракты стеблей.



Результаты анализов суммарного содержания БАВ и АОА в экстрактах различных частей *S. baccifera*: А — ФС; В — флавоноиды; В — флавонолы; Г — ГКК; Д — танины; Е — АОА. Разные буквы обозначают статистически значимые различия между содержанием БАВ в разных частях растения (ANOVA с критерием Тьюки,  $p \leq 0,05$ )

## ЛОКАЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ОПЕРАЦИЯХ НА ТРАХЕЕ

И. С. Курганский<sup>1</sup>, С. А. Лепехова<sup>2</sup>, Е. Г. Григорьев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Иркутский научный центр хирургии и травматологии

<sup>2</sup>Иркутский научный центр СО РАН

✉ kurg.is@mail.ru

### Аннотация

Актуальная проблема в медицине — поиск патогенетически обоснованных методов профилактики РСТ, направленных на стимуляцию регенерации стенки трахеи с помощью методов биотехнологии. Одним из факторов, обеспечивающим регенерацию, является показатель роста эндотелия сосудов. Исследование позволяет определить значимость локального воздействия VEGF на ключевые механизмы регенерации при хирургической реконструкции трахеи.

Цель данной работы — оценить эффективность локальной стимуляции ангиогенеза при восстановительных операциях на трахее. Выполняли восстановительную операцию на трахее 60 крысах-самцах линии *Wistar* в возрасте 10 месяцев, используя оригинальный биокомпозиционный материал [1], содержащий VEGF. Затем проводили сравнение с 3 группами контроля на 1, 3, 7 и 21-е сутки. Оценивались показатели красной и белой крови, неспецифического иммунитета, ИФА, бактериологии, ранотензиометрии, гистологии и морфометрии.

Установлено, что эпителизация дефекта слизистой оболочки наступает на 7-е сутки в результате активного неоангиогенеза со статистически значимым увеличением количества и площади сосудов. Прочность послеоперационного рубца с уменьшением его толщины статистически значимо повышается. БКМ с VEGF способствует купированию общей и местной воспалительной реакции. Выявлено, что статистически значимо снижается количество лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов в течение 21 суток. В результате активации неспецифического клеточного иммунитета статистически значимо увеличиваются фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, спонтанный и индуцированный НСТ с третьих суток применения БКМ с VEGF. Закономерностью регенерации после ушивания раны передней стенки трахеи и аппликации БКМ, содержащего VEGF, было статистически значимое уменьшение послеоперационного рубца, толщины стенки трахеи и увеличение площади сосудов в зоне вмешательства по сравнению с группой контроля.

Таким образом, предложенный в эксперименте метод стимуляции локальной регенерации при помощи пленки пролонгированного действия позволяет применять биокомпозиционный материал с фиксацией его в зоне оперативного вмешательства до 21 суток. В течение этого времени происходит элиминация VEGF с максимальным повышением концентрации в плазме крови на третьи сутки.

В эксперименте установлена высокая эффективность профилактики развития РСТ и несостоятельности швов трахеи после восстановительной операции при использовании VEGF. Она проявляется увеличением количества и площади сосудов, ограничением воспаления, стимуляцией неспецифического звена иммунитета, ранней эпителизацией слизистой оболочки, уменьшением толщины послеоперационного рубца и улучшением его прочности. Предложена концепция механизмов регенерации стенки трахеи после восстановительной операции при локальном воздействии VEGF.

### Литература

1. Пат. 2678200 Российская Федерация. Лекарственная пленка пролонгированного действия и способ ее получения / Курганский И. С., Фаткулин Р. Р., Лепехова С. А. и др. № 018127796; заявл. 27.07.2018; опубл. 24.01.2019; Бюл. № 3.

## МАТЕРИАЛЫ ТИПА «ДРОЖЖЕВЫЕ КЛЕТКИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫХ ОБОЛОЧКАХ»: СИНТЕЗ, АРХИТЕКТУРА И ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ\*

Д. Г. Лаврова, О. Н. Понаморева

Тульский государственный университет, Тула

✉ d.g.fedoseeva@gmail.com

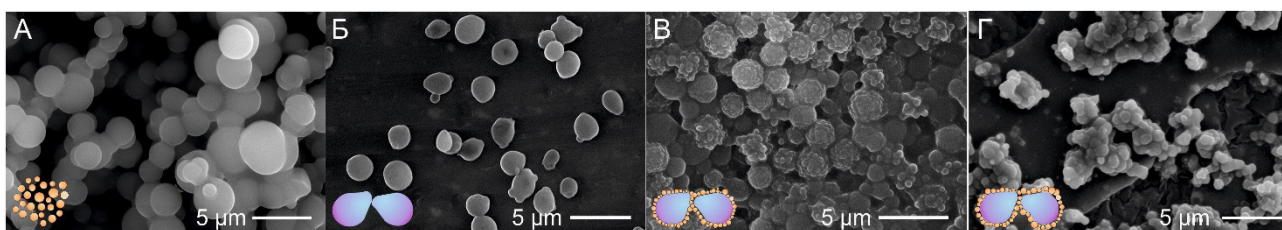
### Аннотация

В работе представлены результаты исследований по формированию и анализу структуры гибридных материалов типа «клетка в оболочке», полученных в условиях одностадийного золь-гель синтеза путем иммобилизации дрожжевых клеток в органосиликатные оболочки из тетраэтоксисилана и метилтриэтоксисилана в присутствии гидрофильных полимеров. Инкапсулированные микроорганизмы применили при разработке капельного биофильтра для очистки метанолсодержащих стоков.

Использование иммобилизованных микроорганизмов в процессах удаления остаточных вредных загрязнений в сточных водах предприятий имеет ряд преимуществ по сравнению со свободными клетками [1, 2]. Предполагается, что подобные технологии очистки продолжают быстро развиваться и коммерциализоваться [3]. В настоящее время интенсивно разрабатываются методы получения биогридных материалов, в которых клетки покрыты искусственными оболочками, обеспечивающими им защиту от механического, химического и биологического воздействий окружающей среды [4, 5]. Биогриды на основе соединений кремния имитируют природные одноклеточные организмы — диатомовые водоросли, которые формируют на своей поверхности защитный силикатный экзоскелет [6]. Для создания таких биогридных материалов применяют мягкие методы золь-гель химии. Исходными соединениями для синтеза подобных материалов обычно служат алкоксисиланы, легко гидролизующиеся с последующей конденсацией и образованием трехмерной, но жесткой сетки кремнезема. Добавление алкилалкоксисиланов с негидролизующимися связями Si-C позволяет получать гибкие органосиликатные материалы. Для производства материалов заданной структуры используют гидрофильные полимеры, которые способны формировать гидрогели и участвовать в золь-гель процессах образования силикатных материалов [7–9]. В случае применения в системе микроорганизмов гидрофильные полимеры не только действуют как структуроуправляющие агенты, но и обеспечивают благоприятное окружение для иммобилизованного биоматериала.

В работе в условиях одностадийного золь-гель синтеза получены биогриды на основе иммобилизованных дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 в органосиликатные матрицы из тетраэтоксисилана (ТЭОС) и метилтриэтоксисилана (МТЭС) в соотношении 15 : 85 % об., гидрофильных полимеров поливинилового спирта (ПВС) и полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Структурные особенности полученных материалов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (см. рисунок).



СЭМ-микрофотографии: органосиликатный гидрогель (А); свободные клетки *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 (Б); биогриды на основе инкапсулированных клеток в органосиликатный гидрогель из ТЭОС, МТЭС и ПВС [10] (В) и из ТЭОС, МТЭС и ПЭГ [9] (Г)

Органосиликатная матрица без дрожжей представлена сферическими частицами размером 1–2 мкм (см. рисунок, А), которые по виду сопоставимы с клетками *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 (см. рисунок, Б). В биогридных материалах формируются сферические частицы силикагеля на поверхности клеток (при ПВС — диаметр меньше 0,2 мкм, см. рисунок, В [10]; при ПЭГ — диаметр около 0,4 мкм, см. рисунок, Г [9, 11]), при этом инкапсулированные дрожжи объединены в органосиликатном матриксе. С одной стороны, гидрофильные полимеры

\* Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания в области научной деятельности (№ FEWG-2020-0008).

выполняют роль структуроуправляющих агентов в золь-гель синтезе силикатных материалов, взаимодействуя с соединениями кремния, а с другой стороны, обеспечивают благоприятное окружение для клеток микроорганизмов, уменьшая давление жестких структур кремнезема на живые клетки.

Инкапсулированные микроорганизмы применили при разработке биофильтра для очистки метанолсодержащих стоков. В условиях естественной аэрации окислительная мощность составила 60–70 гO<sub>2</sub>/(м<sup>3</sup>\*90 мин). Принудительная аэрация биофильтров позволила увеличить их эффективность в 3 раза, а степень очистки сопоставима с нормой капельных биофильтров. Разработанные биогибридные материалы на основе инкапсулированных микроорганизмов в органосиликатную матрицу (МТЭС, ТЭОС и ПЭГ или ПВС) являются эффективными и стабильными биокатализаторами, не теряющими активности в течение года при –18 °С.

### Литература

1. López-Menchero J. R. et al. Effect of calcium alginate coating on the cell retention and fermentation of a fungus-yeast immobilization system // *Lwt.* 2021. Vol. 144. P. 1–9.
2. Rafiee F., Rezaee M. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications // *J. Biol. Macromol.* 2021. Vol. 179. P. 170–195.
3. Zhang H. et al. Use of Immobilized Bacteria for Environmental Bioremediation: A Review // *J. Hazard. Mater.* 2020. P. 1–60.
4. Holzmeister I. et al. Artificial inorganic biohybrids: The functional combination of microorganisms and cells with inorganic materials // *Acta Biomater.* 2018. Vol. 74. P. 17–35.
5. Rathore S. et al. Microencapsulation of microbial cells // *J. Food Eng.* 2013. Vol. 116, № 2. P. 369–381.
6. Yang S. H. et al. Mussel-Inspired Encapsulation and Functionalization of Individual Yeast Cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 9. P. 2795–2797.
7. Tong B. et al. Double cross-linking PVA-SiO<sub>2</sub> hybrid membranes for alkali recovery // *Sep. Purif. Technol.* 2017. Vol. 174. P. 203–211.
8. Liu H. et al. Amino-functionalized mesoporous PVA/SiO<sub>2</sub> hybrids coated membrane for simultaneous removal of oils and water-soluble contaminants from emulsion // *Chem. Eng. J.* 2019. Vol. 374. P. 1394–1402.
9. Lavrova D. G. et al. Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol-gel encapsulated yeast cells // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2018. Vol. 88, № 1. P. 1–5.
10. Lavrova D. G. et al. Impact of hydrophilic polymers in organosilica matrices on structure, stability, and biocatalytic activity of immobilized methylotrophic yeast used as biofilter bed // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. Vol. 15. P. 109879.
11. Ponamoreva O. N. et al. Biohybrid of methylotrophic yeast and organically modified silica gels from sol-gel chemistry of tetraethoxysilane and dimethyldiethoxysilane // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2019. Vol. 92, № 2. P. 359–366.



АНАЛИЗ КВЕРЦЕТИНА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ *TRAMETES POLYZONA* SUB 8447059

А. Д. Латипова, И. Ш. Прозорова, Е. В. Сысоева, М. А. Сысоева

Казанский национальный исследовательский технологический университет

✉ Latipova272@yandex.ru

**Аннотация**

Разработка технологий получения биологически активных веществ с помощью высших грибов — актуальная задача, для решения которой необходимо подготовить методы идентификации синтезируемых метаболитов. В работе предлагается метод определения кверцетина в культуральной среде *Trametes polyzona* — продуцента антиоксидантов, находящихся применение в фармацевтической и пищевой отраслях.

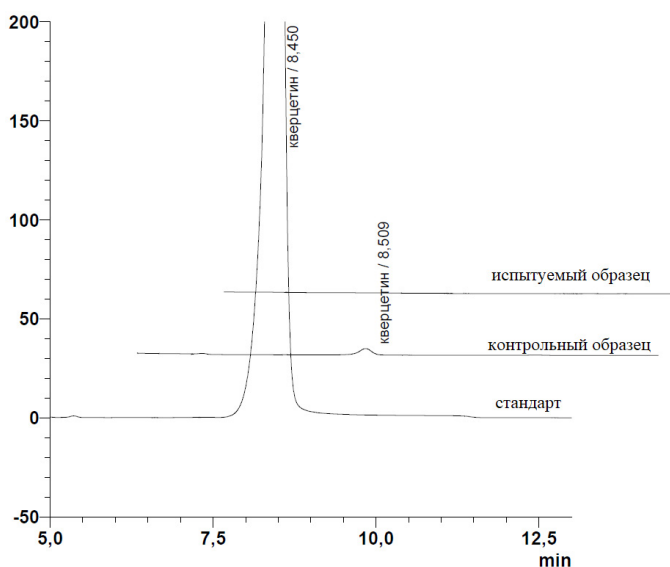
Гриб *Trametes* широко известен своими иммуномодулирующими, антиоксидантными свойствами, способен ингибировать рост нескольких видов раковых клеток, кроме того, в природных условиях накапливает кверцетин до 31,2 мг/г [1, 2]. В настоящее время перспективна разработка культивирования грибов с получением продуктов по свойствам, близким к их природным аналогам. Одна из задач при этом — поиск способов использования среды, остающейся после выращивания биомассы гриба, в которой также могут накапливаться ценные вещества, в том числе кверцетин. Для определения этого флавоноида в культуральной среде *Trametes polyzona* актуально модифицировать наиболее часто применяемый способ — ВЭЖХ [3].

Цель исследования — разработка пробоподготовки и адаптации метода проведения ВЭЖХ-анализа культуральной среды, отделенной от биомассы *Trametes polyzona*, на присутствие в ней кверцетина для дальнейшего ее использования в качестве продукта — биологически активной добавки с антиоксидантными свойствами.

В качестве объектов для проведения ВЭЖХ-анализа была взята культуральную среду гриба *Trametes polyzona* SUB 8447059 на овсяном отваре, которую предварительно отделили от биомассы, концентрировали на вакуумном роторном испарителе и высушили конвективно-кондуктивным методом при 40 °С.

Подобраны растворители для анализа. Используются водные растворы аммиака, этанола и ДМСО. Лучшие результаты получены для растворения культуральной среды и кверцетина при соотношении ДМСО и воды 1 : 5, с последующей обработкой в УЗ-ванне в течение 3 мин.

Исследования подготовленных образцов проводили на хроматографе Shimadzu LC 20 Prominence с УФ-детектированием на колонке Atlantis 150 × 4,6 C18, 5 мкм, защищенной предколонкой. В качестве подвижной фазы использованы ацетонитрил и 0,04 М дигидрофосфат калия, подкисленный ортофосфорной кислотой до pH 2,8 с помощью градиентного режима элюирования [4], при этом на хроматограммах появлялись неидентифицированные пики. В связи с этим был изменен режим на изократический и применена подвижная фаза ацетонитрил с 0,2%-й ортофосфорной кислотой. Для коррекции времени удерживания пика кверцетина варьировали соотношение ацетонитрил / 0,2%-я фосфорная кислота в подвижной фазе. Оптимальными условиями хроматографирования выбраны следующие: длина волны 256 нм, изократический режим, подвижная фаза: 0,2%-я фосфорная кислота (75 %) / ацетонитрил (25 %). Скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 25 °С, объем вводимой пробы 5 мкл (см. рисунок). Время удерживания пика стандарта кверцетина составило около 8 мин. В качестве контрольного образца использовали культуральную среду гриба, выращенного на овсяном отваре с добавлением кверцетина в концентрации 10<sup>-3</sup> мг/мл. Видно, что на хроматограмме контрольного образца присутствует пик, соответствующий по времени удерживания пику стандарта кверцетина. В испытуемом образ-



Хроматограммы стандартного раствора кверцетина и испытуемых образцов

це кверцетин не обнаружен. Таким образом, при культивировании *Trametes polyzona* SUB8447059 кверцетин не экскретируется грибом в среду, поэтому необходимо исследовать ее свойства и состав для дальнейшего применения.

#### **Литература**

1. Pop R. M. et al. Characterization of *Trametes versicolor*: medicinal mushroom with important health benefit // Not. Bot. Horti Agrobi. 2018. Vol. 46 (2) P. 343–349.
2. Janjušević L. et al. The lignicolous fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1920): a promising natural source of antiradical and AChE inhibitory agents // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2017. Vol. 32 (1). P. 355–362.
3. Pardo-Barrela J. et al. Comparison of methods for rapid analysis of quercetin // Plant Foods Hum. Nutr. 2015. Vol. 70 (1). P. 91–6.
4. Зимина Л. Н. и др. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятнистого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Мед. альм. 2012. Т. 2 (21). С. 227–229.

## КОМБИНИРОВАННЫЕ ЛИПИДНО-ПОЛИМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ТЯЖЕЛЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ\*

И. М. Ле-Дейген, П. В. Мамаева, А. С. Сафронова, А. А. Скуредина, И. М. Колмогоров, Е. В. Кудряшова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

✉ i.m.deygen@gmail.com

### Аннотация

Предложен подход к созданию новых форм антибактериальных препаратов на основе липидно-полимерных комплексов. Для препаратов фторхинолонового ряда предложено использование носителей на основе хитозана, модифицированного  $\beta$ -циклодекстринами, которые способны образовывать устойчивые комплексы с липосомальным рифампицином. Полученные системы всесторонне изучены физико-химическими методами анализа.

Сегодня остро стоит проблема терапии тяжелых инфекций, в том числе и поражающих дыхательные пути. Для борьбы с такими заболеваниями перспективным представляется использование комбинированных систем, поскольку, как правило, только один антибактериальный препарат не справляется с уничтожением патогенных микроорганизмов. Более того, ненадлежащее применение антибактериальных препаратов приводит, в свою очередь, к появлению мультирезистентных штаммов микроорганизмов. Создание системы одновременной доставки нескольких препаратов с контролируемым высвобождением содержимого может позволить решить данные проблемы. Такие системы должны быть биосовместимыми и обладать высокой емкостью по препаратам. Важным требованием также является возможность введения лекарственной формуляции ингаляционным путем и ее мукоадгезивность.

В настоящей работе данная проблема решается на примере клинически важных антибактериальных препаратов, используемых в лечении тяжелых инфекций: левофлоксацина (ЛФ) и рифампицина (РФ). РФ — неполярное малорастворимое в воде вещество, для доставки которого целесообразно применять липосомы различного липидного состава. В качестве носителя для ЛФ предложены производные хитозана, модифицированные производными  $\beta$ -циклодекстрина. Хитозан обеспечивает высокую мукоадгезивность и сродство к липосомальной мембране, в то время как торы  $\beta$ -циклодекстрина способны образовывать комплексы «гость — хозяин» с молекулами ЛВ.

Получены производные хитозана 5 кДа, модифицированные  $\beta$ -циклодекстринами (амино-циклодекстрином  $\text{NH}_2\text{-CD-Chit}$  и гидроксипропил-циклодекстрином  $\text{Hp-CD-Chit}$ ). С помощью методов УФ-, Фурье-ИК-спектроскопии и флуоресцентного анализа установлены величины констант диссоциации комплексов ЛФ с конъюгатами (см. таблица). Данные, полученные с использованием различных методов, сходятся по порядку значений между собой.

### Значения констант диссоциации комплексов левофлоксацина с лигандами $\text{NH}_2\text{-CD-Chit}$ , $\text{Hp-CD-Chit}$ , $\text{Hp-CD}$ , полученные с помощью различных методов

$K_{dis}, M$	Метод	Лиганд		
		$\text{NH}_2\text{-CD-Chit}$	$\text{Hp-CD-Chit}$	$\text{Hp-CD}$
	УФ-спектроскопия	$(4,8 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$	$(4,8 \pm 1,8) \cdot 10^{-5}$	$(2,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$
	Флуоресцентная спектроскопия	$(1,25 \pm 0,80) \cdot 10^{-5}$	$(6,2 \pm 1,1) \cdot 10^{-5}$	$(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
	ИК-спектроскопия	$(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	—	—

Получены и охарактеризованы с помощью методов DLS- и ATR-FTIR-спектроскопии липосомальные формы рифампицина (ЛРФ) на основе липосом состава дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) 100 % и смешанных на основе ДПФХ с включением 20 % массовых анионного липида кардиолипина (КЛ). ДПФХ 100 % липосомы представляют собой жесткую гомогенную мембрану, которая при комнатной температуре находится в гелеобразном состоянии и считается условно нейтральной, так как большая часть зарядов фосфатных групп липидов экранирована от потенциального взаимодействия с катионными лигандами, например: аминогруппами хитозана, холиновыми группами. Напротив, липосомы ДПФХ : КЛ, которые также при комнатной температуре находятся в гелеобразном состоянии, характеризуются ярко выраженными анионными свойствами.

\* Работа выполнена при поддержке Гранта Президента для молодых кандидатов наук (№ 075-15-2022-397).

© И. М. Ле-Дейген, П. В. Мамаева, А. С. Сафронова, А. А. Скуредина, И. М. Колмогоров, Е. В. Кудряшова, 2022

Получены комплексы липосомальных форм рифампицина с конъюгатами хитозана с циклодекстрином. На основании данных ИК-спектроскопии установлено, что основными сайтами связывания полимера на липидной матрице являются фосфатная и карбонильная группы липидов, причем комплекс значительно более стабилен для липосом, содержащих кардиолипин.

В дальнейшем планируется отобрать наиболее перспективные лекарственные формы и сравнить их антибактериальные свойства *in vitro*.

## ВЛИЯНИЕ ГИДРОФОБНОГО СУБСТРАТА НА ПРОДУКЦИЮ ГЛИКОЛИПИДНЫХ БИОСУРФАКТАНТОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS X5*\*

Т. И. Леонова, Е. В. Акатова

Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии,  
Научно-исследовательский центр «БиоХимТех», Тульский государственный университет

✉ tatyanka-leonova-99@mail.ru

### Аннотация

Определены параметры роста *Rhodococcus erythropolis X5* на 2 и 5 % подсолнечного масла на минеральной среде Эванса. Установлена оптимальная концентрация источника углерода (2 %), при которой сохраняется высокий уровень жизнеспособных клеток, количество биосурфактантов (биоПАВ) на 7-е сутки роста достигало 0,36 г/л. Отмечено, что увеличение концентрации субстрата незначительно влияет на выход биоПАВ.

БиоПАВ — это поверхностно-активные вещества (ПАВ), продуцируемые живыми организмами и имеющие ряд преимуществ перед синтетическими ПАВ: биоразлагаемость, синтез из дешевого сырья (например, отходы различных производств), стабильность свойств в широком диапазоне pH и температур, отсутствие токсичности и т. д. [1].

Несмотря на многообразие свойств и преимущества биоПАВ, их промышленное производство намного ниже, чем химических веществ. Высокая себестоимость изготовления, а также низкая концентрация биоПАВ в культуральной среде сдерживают широкое применение микробных ПАВ [2]. На выработку биоПАВ влияет ряд условий [3]. Важный фактор в процессе оптимизации и снижении затрат на производство биоПАВ — подбор наиболее дешевого субстрата. При изучении процессов синтеза биоПАВ часто в качестве источника углерода используют алканы, однако чистые вещества дорогостоящие. Альтернативой могут служить легкодоступные возобновляемые источники, например растительные масла.

Цель работы — подобрать оптимальную концентрацию субстрата, позволяющую повысить количественный выход гликолипидных биоПАВ, продуцируемых бактериями *Rh. erythropolis X5* при росте на подсолнечном масле.

Штамм X5 культивировали при температуре 28 °С, pH 7,0 на минеральной среде Эванса, содержащей в качестве субстрата подсолнечное масло при 2 и 5 % от объема среды.

Для определения параметров роста и отслеживания динамики продукции биоПАВ получены кривые роста культуры (рис. 1), так как вторичные метаболиты продуцируются в конце экспоненциальной и в период стационарной фазы роста культуры. Более быстрый выход на стационарную фазу отмечен при концентрации субстрата 2 %. Однако максимальный показатель оптической плотности (2,5) культуры зафиксирован при концентрации субстрата 5 %. Таким образом, накопление биомассы зависит от количества источника углерода в питательной среде. После 7 суток культивирования количество сырой биомассы при росте на 5 % субстрата увеличилось в 1,6 раза, по сравнению с 2 % (9,3 и 6 г/л соответственно).

Несмотря на высокий уровень биомассы и показатель оптической плотности, необходимо было установить количество жизнеспособных клеток во время стационарной фазы роста с помощью высевов по методу Коха. По результатам проведенной оценки уровень жизнеспособных клеток снижается, но остается на высоком уровне.

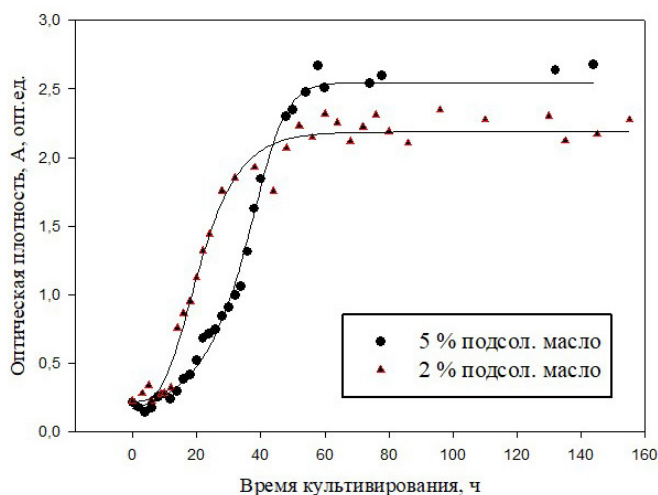


Рис. 1. Кривые роста в периодической культуре бактерий *Rh. erythropolis X5* на подсолнечном масле

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

После 6 суток роста на 5 % подсолнечного масла количество жизнеспособных микроорганизмов составило  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл, на 2 % —  $2,8 \times 10^8$  КОЕ/мл.

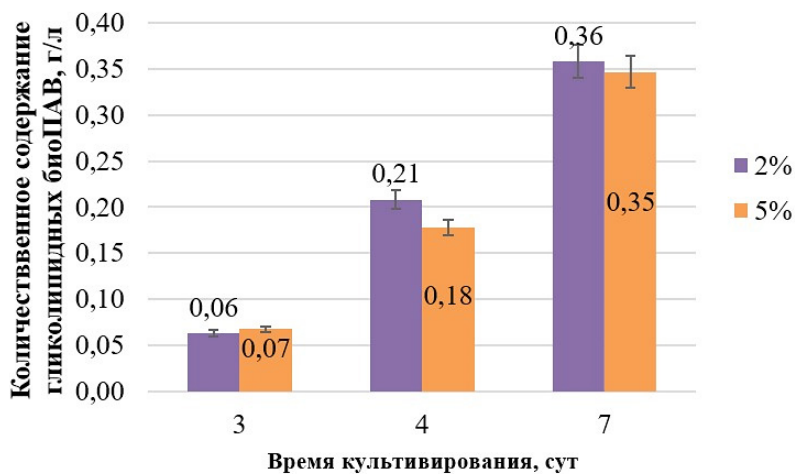


Рис. 2. Количественное содержание биоПАВ, продуцируемых бактериями *Rh. erythropolis* X5

Содержание гликолипидов биоПАВ в культуральной среде без клеток определяли фотометрически фенольно-серным методом [4]. Полученные данные (рис. 2.) указывают на то, с развитием стационарной фазы количество гликолипидных биоПАВ возрастает. На 7-е сутки значения биоПАВ в культуральной жидкости отличаются незначительно. Из чего следует, что увеличение количества субстрата приводит к повышению выхода биомассы, но не продукции биоПАВ.

Снижение выработки биоПАВ при росте на 5 % может быть связано с изменением pH среды. Так, в [5] максимальный выход рамнолипидов достигнут при pH среды 6,8–7,5, тогда как при pH ниже 6,8 количество биоПАВ уменьшалось. Из-

мерение pH культуральной среды на 7-е сутки культивирования штамма X5 показало снижение до 6,4 (2 %) и 6,2 (5 %).

На основании проведенного анализа параметров роста культуры *Rh. erythropolis* X5 и динамики продукции биоПАВ можно заключить, что оптимальной концентрацией субстрата является 2 % от объема среды, поскольку поддерживается достаточно высокий уровень жизнеспособных клеток даже в глубокой стационарной фазе, а количество биоПАВ возрастает. Увеличение концентрации субстрата незначительно влияет на выход биоПАВ.

### Литература

1. Banat I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 87, №. 2. P. 427–444.
2. Рудакова М. А., Галицкая П. Ю., Селивановская С. Ю. Биосурфактанты: современные тренды применения // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2021. Т. 163, № 2. С. 177–208.
3. Sun W. et al. Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas* sp. CO<sub>2</sub> and its application for remediation of heavy metal contaminated soil // Chemosphere. 2021. Vol. 265. P. 1–46.
4. Лыонг Т. М. и др. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus*-потенциальные продуценты биосурфактантов // Изв. вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. № 1 (16). С. 50–60.
5. Chen S. Y., Wei Y. H., Chang J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 76, № 1. P. 67–74.

## «РОЗОВАЯ» ВОДА МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА СУБАРКТИКИ: ПРИЧИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ\*

Т. И. Ловдина<sup>1,2</sup>, А. С. Аксенов<sup>1,2</sup>, С. А. Забелина<sup>1</sup>, Л. С. Широкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ комплексного изучения Арктики им. Н. П. Лаверова УрО РАН, Архангельск

<sup>2</sup>Северный (Арктический) федеральный университет им. М. В. Ломоносова, Архангельск

✉ tanya.lovdina@yandex.ru

### Аннотация

Озеро Светлое (бассейн Белого моря) является уникальным водоемом европейской субарктики, в хемоклине которого содержится 25 % цианобактерий от суммы прокариот. В анаэробных условиях представители рода *Synechococcus* выделяют красный пигмент фикоэритрин и придают воде розоватый цвет. Эти и другие особенности функционирования изучаемых цианобактерий при низких температурах создают перспективы для новых биотехнологических применений.

Меромиктическое оз. Светлое, расположенное в Архангельской области, благодаря меромиксии железомарганцевого типа и метаногенезу является прототипом древнего океана [1]. Прозрачность озера 12 м и фотический слой по его всей глубине создают благоприятные условия для различных групп фототрофных прокариот, например бактерий рода *Synechococcus*, распространенных в хемоклине (20–24 м) и монимолимнионе (25–38 м) озера. Это мелкие кокки диаметром около 1 мкм [2], флуоресцирующие красным цветом в ультрафиолете с красителем DAPI (рис. 1).

Максимальная численность и биомасса бактерий *Synechococcus* — на глубине 24 м 1,60 млн кл/мл и 1,06 мг/л соответственно, а минимальные — на 33 м 0,33 млн кл/мл и 0,15 мг/л соответственно. Оптимальный прирост *Synechococcus* наблюдается при низкой освещенности и сниженной концентрации кислорода, что обуславливает накопление пигмента фикоэритрина в клетках и, как следствие, розовую окраску воды хемоклина [2].

В апреле 2021 г. был проведен метагеномный анализ микробных сообществ оз. Светлое по участкам гена 16S рРНК (Illumina) и определено, что бактерии *Synechococcales* самые многочисленные в озере — 24,8 % на 22,5 м, с глубиной их количество снижается до 16,4 % на 33 м (рис. 2).

Активная вегетация цианобактерий часто сопровождается выделением и накоплением в водной среде веществ, представляющих пользу для жизни и здоровья человека (рис. 3).

В настоящее время биотехнологический потенциал *Synechococcus* sp. в этом озере еще не раскрыт. Однако в мире цианобактерии этого рода широко применяются для получения микоспорин-подобных аминокислот с фотозащитными свойствами, гемопоэтических стволовых клеток, препарата от цере-

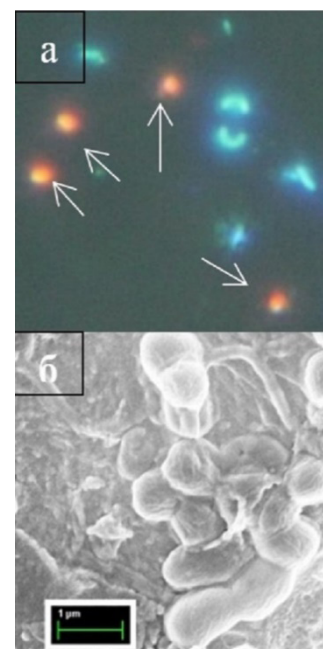


Рис. 1 Микрокопирование клеток *Synechococcus* sp.: а — люминесцентная окраска; б — в сканирующем микроскопе ZEISS «SIGMA VP»

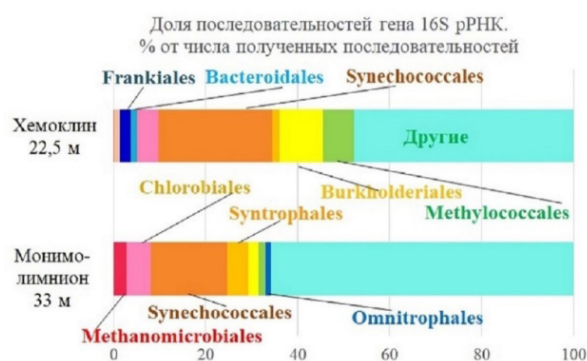


Рис. 2. Распределение порядков сообществ прокариот в оз. Светлое

\* Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда (№ 22-27-00828) — «Оценка эмиссии углерода ( $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ ) с поверхности внутренних водоемов Европейского Севера России».

© Т. И. Ловдина, А. С. Аксенов, С. А. Забелина, Л. С. Широкова, 2022

брального артериального тромбоза. Культивирование *Synechococcus* sp. при определенных условиях приводит к образованию продуктов с биологической активностью (богатый цинком нанополифосфат, подсластитель эритрит, полиоксимасляная кислота как биоразлагаемая смола). Наибольший интерес в биотехнологии имеют производимые бактериями рода *Synechococcus* ферменты и белки: фикоцианин — пигментно-ферментный комплекс, источник эссенциальных микроэлементов и пищевого красителя; цианофицинсинтетаза, способная образовывать



Рис. 3. Направления применения бактерий рода *Synechococcus*

растворимый в воде, кислой и щелочной среде биополимер цианофицин, применяемый в биоразлагаемых смягчителях воды и средствах для адресной доставки лекарств. В настоящее время с помощью генетической модификации ученые создают бактерии рода *Synechococcus*, способные синтезировать этанол, биодизельное топливо, желтый пигмент зеаксантин, полимолочную кислоту, сквален, ацетон, крахмал, целлюлозу, изменяющий осмоларность эпидермиса глицерил глюкозид.

Таким образом, «розовый» хемоклин оз. Светлое имеет малоизученный микробный потенциал прокариот *Synechococcus*, развитие которого приведет к получению важных биотехнологических продуктов: лекарственных и ферментных препаратов, полисахаридов, красителей и других БАВ.

### Литература

1. Чупаков А. В. и др. Гидрохимические особенности пресноводного меромиктического оз. Светлое (Архангельская область) // Arctic Environ. Res. 2013. № 1. С. 20–31.
2. Забелина С. А. и др. Сезонная динамика фотосинтетических пигментов в пресноводном меромиктическом озере // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем. 2014. С. 119.



## СПОСОБНОСТЬ К РОСТУ ИНВАЗИВНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ *MICROCYSTIS AERUGINOSA* НА РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ ВЕЧНОМЕРЗЛЫХ ТОРФЯНИКОВ\*

Т. И. Ловдина, Л. С. Широкова

ФИЦ комплексного изучения Арктики им. Н. П. Лаверова УрО РАН, Архангельск

✉ tanya.lovdina@yandex.ru

### Аннотация

Для прогнозов эмиссии углерода вечномерзлых торфяников в атмосферу изучена возможность роста типичных инвазивных цианобактерий *Microcystis aeruginosa* в поверхностных водах вечной мерзлоты. Лабораторный рост цианобактерий в различных богатых органикой водах приводил к увеличению pH и бактериальному поглощению C со скоростью, в несколько раз превышающей скорость выделения C-CO<sub>2</sub> в вечномерзлых торфяниках, что может повлиять на гетеротрофный статус термокарстовых озер.

Потепление арктических и субарктических вод приводит к увеличению цветения фитопланктона, что может сильно изменить баланс углерода в водоемах и обмен CO<sub>2</sub> с атмосферой. Из-за тенденции глобального потепления новые инвазивные цианобактерии, уже распространенные в тропических и умеренных регионах, могут мигрировать на север и колонизировать термокарстовые озера на территориях, затронутых вечной мерзлотой. Изображение такого озера приведено на рис. 1. На вечномерзлых торфяниках питательные вещества, поступающие из тающего торфа, могут еще больше усилить рост цианобактерий. Чтобы лучше понять механизм размножения цианобактерий в поверхностных водах районов вечной мерзлоты, изучен лабораторный рост типичных инвазивных цианобактерий *Microcystis aeruginosa* в различных богатых органикой водах, характерных для торфяников вечной мерзлоты. Вода термокарстовых озер, водные вытяжки мха и лишайника были наиболее благоприятным субстратом для массового роста цианобактерий, в то время как мерзлый торф менее подходит для их развития. Последнее может быть вызвано подавлением роста токсичными металлами или органическими веществами, выделяющимися из торфяного льда. На рис. 2 представлено цветение термокарстового озера, вызванное цианобактериями.

Рост цианобактерий в присутствии всех органических субстратов приводил к повышению pH раствора на две единицы, увеличению концентрации растворенного неорганического углерода (РНУ) в 3–5 раз и значительному (30–50 %) снижению концентрации растворенного органического углерода (РОУ). Увеличение степени ароматичности РОУ (SUVA) отражает преимущественное поглощение цианобактериями алифатических, оптически прозрачных органических веществ.

Принимая во внимание количество биомассы, полученное за 15 дней инкубации (т. е. увеличение в 2–3 раза по сравнению с первоначальным количеством составляет около 2 г/л, или 6,6 мг С л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>), и глубину фотического слоя поверхностных вод на богатых органикой торфяниках вечной мерзлоты в 0,5–1,0 м, рост цианобактерий в течение двухнедельного периода цветения



Рис. 1. Изображение термокарстового озера



Рис. 2. Цветение термокарстового озера, вызванное цианобактериями

\* Исследование выполнено в рамках проекта Российского научного фонда (№ 22-17-00253) — «Биогеохимия углерода и сопряженных микроэлементов в экосистемах торфяных болот Северо-Запада России в гидрологическом континууме».

может привести к поглощению С в диапазоне от 2 до 6 г С-СО<sub>2</sub> м<sup>-2</sup> сут<sup>-1</sup>. Такая высокая скорость поглощения может упразднить гетеротрофный статус термокарстовых озер (площадь > 1000 м<sup>2</sup>) на торфяниках вечной мерзлоты (в настоящее время выделяется от 1 до 2 г С-СО<sub>2</sub> м<sup>-2</sup> сут<sup>-1</sup>, [1]). Следовательно, оценка способности к росту инвазивных цианобактерий необходима для количественных прогнозов будущего обмена углерода с атмосферой в поверхностных водах вечномерзлых торфяников.

#### **Литература**

1. Zabelina S. V., Shirokova L. S., Klimov S. I. et al. Seasonal and spatial variations of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> concentrations and fluxes in surface waters of frozen peatlands (NE Europe): morphological and hydrochemical control // *Limnology Oceanography*. 2021. Vol. 66, № S1. P. S216–S230.

**СИНТЕЗ АУКСИНОВ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ\***

М. Т. Лутфуллин, О. Э. Моисеева, А. М. Марданова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ lutfullin.marat20112@yandex.ru

**Аннотация**

Максимальный синтез индол-3-уксусной кислоты ( $27,90 \pm 0,70$  мкг/мл) на среде LB наблюдали у штамма *Pseudomonas putida* MG-8, на среде M9 (триптофан-независимый путь синтеза) — у штаммов *Pseudomonas libanensis* MG-3, *Ochrobactrum grignonense* MG-4 и *Bacillus subtilis* GM27.

Способность ризобактерий продуцировать фитогормоны (ауксины в качестве вторичных метоболитов) — наиболее распространенный механизм их положительного влияния на рост растений. Фитогормоны класса ауксинов включают большое количество разнообразных представителей, среди которых наиболее значимым является индол-3-уксусная кислота (ИУК). Фактически во всей литературе ауксин часто взаимозаменяется ИУК. Ауксины участвуют в геотропизме и фототропизме, дифференцировке сосудистой ткани, апикальном доминировании, делении клеток, удлинении ствола и корня растений. Способность к синтезу ИУК обнаружена у многих ризосферных бактерий. Основной предшественник синтеза ИУК — триптофан. Добавление триптофана в питательные среды во всех случаях приводит к увеличению продукции данного ауксина.

Концентрацию ИУК в культуральной жидкости определяли по методу *Gordon, Weber*, 1951. Бактерии выращивали на среде M9 с добавлением 0,4 % глюкозы в качестве источника углерода и на среде LB при 30 °C в термостате-шейкере с качанием 200 об/мин (*INFORS HT Standard*, Швейцария). Клетки отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 мин, в супернатанте определяли концентрацию ИУК. К 100 мкл супернатанта добавляли 400 мкл реагента Сальковского (1 мл 0,5 М FeCl<sub>3</sub>, 30 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 50 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. О продукции ИУК судили по появлению розовой окраски, которую количественно оценивали по поглощению при 540 нм. Калибровочная кривая построена с использованием *Indole acetic acid (Sigma-Aldrich*, Италия).

При исследовании синтеза ауксинов на среде LB и минимальной среде M9 показано, что максимальная концентрация ауксинов в культуральной жидкости была при культивировании на среде LB у штамма *Pseudomonas putida* MG-8 на 72 ч и составляла  $27,90 \pm 0,70$  мкг/мл. Концентрация ауксинов у изолятов *Bacillus subtilis* GM8, *Bacillus subtilis* GM27, *Pseudomonas libanensis* MG-3, *Pseudomonas* sp. D4, *Pseudomonas* sp. D5, *Ochrobactrum grignonense* MG-4, *Achromobacter spanius* MG-5 была на уровне  $13,78 \pm 0,35$  —  $19,13 \pm 0,48$  мкг/мл. Высокая концентрация ауксинов при культивировании на среде LB, вероятно, вызвана наличием в среде L-триптофана, который является предшественником при синтезе ауксинов у большинства ризосферных бактерий. В природе ИУК синтезируется растениями и ростостимулирующими бактериями из аминокислоты триптофана, общего предшественника корневых экссудатов, через биохимические реакции переаминирования и декарбоксилирования. При исследовании на минимальной среде M9 максимальная концентрация ауксинов была у штаммов *B. subtilis* GM27, *P. libanensis* MG-3, *O. grignonense* MG-4 на 72 ч культивирования и составляла  $18,52 \pm 0,46$ ,  $18,10 \pm 0,45$ ,  $17,15 \pm 0,43$  мкг/мл. У штамма *P. putida* MG-8 максимальная концентрация наблюдалась на 24 ч культивирования и достигала  $18,83 \pm 0,47$  мкг/мл, на 48 и 72 ч концентрация снижалась до  $16,29 \pm 0,41$  и  $15,85 \pm 0,40$  соответственно.

Таким образом, уровень синтеза ауксинов ризобактериями на среде M9 ниже по сравнению с синтезом на среде LB. Культивирование на среде M9 позволяет выявить бактерии и уровень синтеза ауксинов по триптофан-независимому пути.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 20-316-90047).

© М. Т. Лутфуллин, О. Э. Моисеева, А. М. Марданова, 2022

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА РИЗОСФЕРЫ И РИЗОПЛАНЫ КАРТОФЕЛЯ  
СОРТА ЖУКОВСКИЙ РАННИЙ\***

Г. Ф. Лутфуллина<sup>1</sup>, М. Т. Лутфуллин<sup>2</sup>, Д. С. Пудова<sup>1</sup>, Е. И. Шагимарданова<sup>3</sup>,  
З. Сташевски<sup>4</sup>, С. Г. Вологин<sup>4</sup>, М. Р. Шарипова<sup>2</sup>, А. М. Марданова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Институт фундаментальной медицины и биологии, НИЛ «Агробиоинженерия»

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии

<sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Институт фундаментальной медицины и биологии, НИЛ «Молекулярная вирусология»

<sup>4</sup>Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное  
подразделение федерального исследовательского центра КазНИЦ РАН

✉ lutfullin.marat20112@yandex.ru

**Аннотация**

Проведен сравнительный анализ бактериальных сообществ ризосферы и ризопланы растений картофеля сорта Жуковский ранний, культивируемого на серых лесных почвах Республики Татарстан. Структура бактериальных сообществ корней картофеля разнообразна. Качественный состав бактериальной микробиоты ризосферы и ризопланы аналогичен, однако наблюдаются значительные различия в количественном соотношении отдельных групп бактерий в зависимости от стадии роста растений. Это свидетельствует о влиянии растения картофеля на формирование бактериальной микробиоты в разных компартментах.

Бактериальные сообщества ризосферы и ризопланы картофеля сорта Жуковский ранний исследовали методом секвенирования библиотек гена 16S рРНК. Картофель отбирали на 3 разных участках поля по 2 образца на вариант. Для секвенирования подготовили 6 образцов ризосферной почвы и 6 образцов ризопланы. ДНК образцов ризосферы и ризопланы выделяли с помощью коммерческих наборов FastDNA® SPIN Kit for Soil согласно протоколу. ДНК использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР с универсальными праймерами к консервативному участку гена 16S рРНК (For: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG, Rev: 5'-ACGGTTACCTGTTCACGAC TT) с добавлением олигонуклеотидных идентификаторов для каждой пробы. Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе Illumina MiSeq согласно рекомендациям производителя по методу *paired-end*. Биоинформатический анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК осуществляли с помощью программы QIIME (в. 13\_8). Таксономическую структуру сообщества оценивали по долям операционных таксономических единиц (ОТЕ), отнесенных к различным таксонам. Статистический анализ проводили с использованием вычислительной среды R-3.5.2.

Сравнительный таксономический анализ на уровне родов показал, что образцы ризосферы и ризопланы картофеля значительно различаются по представленности разных родов бактерий. В фазе цветения (летом) доминирующими представителями были бактерии рода *Dickeya* (филум *Proteobacteria*): 14,56 % — ризосфера, 31,25 % — ризоплана, доля которых снижалась в фазе старения в ризосфере до 0,63 % и в ризоплане до 0,58 %. Представленность бактерий рода *Pseudomonas*, относящихся к классу *Gamma*proteobacteria, была выше в ризоплане (10,98 %) по сравнению с ризосферой (5,49 %) в фазе цветения. Однако представленность этих бактерий в фазе старения в ризоплане снижалась до 8,58 %, в то время как в ризосфере незначительно повышалась (5,63 %). В фазе цветения количество *Nocardia* в ризосфере составляло 9,46 %, а в ризоплане — 3,53 %, в фазе старения наблюдалось увеличение количества этих бактерий до 16,32 и 6,52 % соответственно. Количество *Rhizobium* в ризосфере в фазе цветения было на уровне 3,55 % и практически не менялось при старении растений (5,17 %). В летний период в ризоплане доля *Rhizobium* была на уровне 2,91 %, но в фазе старения возросла до 5,20 %. Бактерии рода *Pandora* были представлены в прикорневой зоне на достаточно высоком уровне. В фазе цветения количество *Pandora* составляло 12,47 % в ризоплане и 11,98 % в ризосфере, но в фазе старения растений их доля снижалась до 10,57 % в ризосфере и повышалась до 17,89 % в ризоплане. Доля представителей рода *Zymomonas* класса *Alphaproteobacteria* была выше в ризосфере (6,49 %) по сравнению с ризопланой (1,36 %) в фазе цветения. Однако представленность этих бактерий в фазе старения в ризоплане увеличилась до 2,60 %, в то время как в ризосфере незначительно снижалась (5,65 %). Доля бактерий рода

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-16-00138).

---

*Chloroplast* (фила *Cyanobacteria*) была выше в ризоплане (1,20 %) по сравнению с ризопланой (0,33 %) в фазе цветения растений картофеля.

Таким образом, исследование разнообразия микрофлоры ризосферы и ризопланы, закономерностей их формирования, влияния различных факторов на их количественный и качественный состав важно для более глубокого понимания роли ассоциативных бактерий в повышении продуктивности растений картофеля.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ, СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (rhVEGF-A165)<sup>\*</sup>

Д. Д. Лыкошин<sup>1</sup>, Е. Л. Немашкалова<sup>2</sup>, М. П. Шевелева<sup>2</sup>, Е. В. Свирщевская<sup>1</sup>, Р. С. Есипов<sup>1</sup>, Е. И. Дерюшева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН — обособленное подразделение Пушкинского научного центра биологических исследований РАН

✉ ldd-94@ya.ru

### Аннотация

Фактор роста эндотелия сосудов (*Vascular endothelial growth factor* — VEGF) — сигнальный белок, который вырабатывается клетками для стимулирования роста новых сосудов. Интерес к нему вызван, с одной стороны, его прогностической важностью при развитии различных заболеваний, с другой — эффективностью антиангиогенной терапии при лечении некоторых видов рака, тромбоза, ретинопатии и макулодистрофии, а также перспективностью применения терапевтических индукторов ангиогенеза. VEGF-A, в особенности его изоформа VEGF-A 165, играет наиболее важную роль в организме среди других факторов роста. В настоящее время предложено получение рекомбинантного VEGF-A в различных экспрессирующих системах, однако часто они дают низкий выход и неправильный рефолдинг целевого белка. Кроме того, поскольку VEGF-A относится к белкам с большой долей внутренней неупорядоченности, на сегодняшний день отсутствует кристаллическая структура полноразмерного белка, а существующие экспериментальные работы посвящены исследованию его отдельных частей.

В данной работе нуклеотидная последовательность гена, кодирующего изоформу VEGF-A 165, оптимизирована под экспрессию в *E. coli*, получена химико-ферментативным синтезом и клонирована в плазмидный вектор pET-23a(+), на основе которого создан штамм-продуцент. Улучшены условия культивирования штамма-продуцента rhVEGF-A165, подобрана оптимальная схема рефолдинга гомодимерного белка и разработана методика двухстадийной хроматографической очистки. Масса белка подтверждена методом масс-спектрометрического анализа, хроматографическая чистота целевого продукта > 97 %. Выход rhVEGF-A165 составил 15 мг лиофилизата с 6 л клеточной культуры.

Биологическая активность полученного rhVEGF-A165 подтверждена на клетках эндотелия пупочной вены человека (HUVEC). Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста, измерение оптической плотности проводили при длине волны  $\lambda = 540$  нм. Показано, что добавление 300 нг rhVEGF-A165 достоверно стимулирует пролиферацию клеток HUVEC по сравнению с контрольными образцами.

Данные кругового дихроизма подтверждают соответствие вторичной структуры полученного нами рекомбинантного белка структуре VEGF-A165, экспрессированного в эукариотических клетках, а также литературным данным.

Нами впервые предложена трехмерная структура полноразмерного белка VEGF-A165 (гомодимера), смоделированная на основе кристаллографической структуры отдельных доменов димера VEGF (PDB 2VPF) и предсказанных сервером I-TASSER мономерных субъединиц. В структуре выделяются два домена: гепарин-связывающий домен и тромбоцитарный домен (по данным SCOP). Рассчитанные по модели значения содержания элементов вторичной структуры соответствуют данным КД rhVEGF-A165.

Полученные сведения позволят проводить экспериментальные и теоретические исследования взаимодействия rhVEGF-A165 с его природными лигандами и терапевтическими антителами.

<sup>\*</sup> Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-24-00083 (Е. И. Дерюшева).  
© Д. Д. Лыкошин, Е. Л. Немашкалова, М. П. Шевелева, Е. В. Свирщевская, Р. С. Есипов, Е. И. Дерюшева, 2022

## ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b\*

И. А. Макаренко<sup>1</sup>, Л. Ф. Булатова<sup>1</sup>, М. В. Богданов<sup>1,2</sup>, Р. Г. Киямова<sup>1</sup>, Д. В. Савенкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

<sup>2</sup>Медицинская школа МакГоверн, Хьюстон, США

✉ ira.mack.01@mail.ru

### Аннотация

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b — трансмембранный гликопротеин, который имеет С- и N-концевые домены, расположенные в цитоплазме, и большой внеклеточный домен (ВКД) снаружи клетки [1]. Функция транспортера заключается в поддержании фосфатного гомеостаза путем абсорбции неорганического фосфата в тонком кишечнике. Эпитоп в составе ВКД NaPi2b является потенциальным опухоль-специфическим эпитопом, а NaPi2b — мишенью для терапевтических моноклональных антител [1]. Кроме того, N-концевой домен (*N-terminal domain*, NT) транспортера, в связи с динамической топологией NaPi2b, является новой потенциальной мишенью для противоопухолевой терапии ЭРЯ [2]. Поэтому изучение таких доменов важно как для понимания иммуногенности NT NaPi2b в сыворотках больных ЭРЯ, так и для прикладных целей — получения новых моноклональных антител против NT NaPi2b. В связи с данными задачами необходимо произвести очищенный препарат NT NaPi2b с минимальным количеством примесей (< 1 %).

Цель данного исследования — подбор условий для очистки рекомбинантного N-концевого домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b.

Для экспрессии рекомбинантного NT использовали клетки штамма *BL21(DE3)*, трансформированные плазмидой *pGEX4T1/N-NaPi2b* (1-100 а. о.). Индукцию экспрессии фрагмента гена, кодирующего NT транспортера NaPi2b, проводили в 2; 100 и 500 мл среды LB при 18 °С в течение ночи с добавлением 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Рекомбинантный белок очищали с помощью глутатион-агарозы (*Thermo Fisher Scientific*, США), элюцию связанного с глутатион-агарозой белка проводили с помощью элюирующего буфера (5 мМ Hepes pH 8, 200 мМ NaCl, 5 % глицерин, 10 мМ глутатион). При наработке NT в 2 мл LB с последующей аффинной очисткой не обнаружили белка в элюированных фракциях при анализе с помощью гель-электрофореза. При наработке NT в 100 мл LB в элюированных фракциях наблюдали большое количество примесей. Это может быть обусловлено наличием свободной емкости в сорбенте при связывании с рекомбинантным белком, таким образом, нецелевые природные белки с GST-мотивами с более низкой аффинностью могут связываться с сорбентом и элюироваться при проведении очистки. Для уменьшения неспецифического связывания мы использовали перегрузку сорбента большим количеством рекомбинантного белка. При этом с сорбентом преимущественно связываются рекомбинантные белки с GST-тагом, так как природным белкам с GST-мотивами труднее конкурировать за центры связывания на сорбенте. При наработке NT в 500 мл LB в элюциях не наблюдается низко- или высокомолекулярных примесей, выход рекомбинантного белка составил 5 мг с чистотой 98–99 %.

Таким образом, подобраны условия для очистки рекомбинантного N-концевого домена NaPi2b. Посредством варьирования объема среды для экспрессии рекомбинантного белка и количества сорбента глутатион-агарозы удалось добиться максимально чистого выхода рекомбинантного NT (98–99 % чистота) в количестве 5 мг из 25 мл осветленной фракции клеточного лизата *BL21(DE3)*. Данный протокол может быть использован как для очистки полноразмерных гидрофильных белков, так и для отдельных рекомбинантных доменов гидрофобных трансмембранных белков в целях их дальнейшего применения в прикладных и фундаментальных исследованиях.

### Литература

1. Bulatova L., Savenkova D., Nurgalieva A. et al. Toward a Topology-Based Therapeutic Design of Membrane Proteins: Validation of NaPi2b Topology in Live Ovarian Cancer Cells // *Front. Mol. Biosci.* 2022. Vol. 9.
2. Minigulova L. F., Skripova V. S., Nurgalieva A. K. et al. Recognition of the Sodium-Dependent Phosphate Transporter NaPi2b by Monoclonal Antibodies N-NaPi2b in Ovarian Cancer Cells // *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta.* 2020. Vol. 162.

\* Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства (Приоритет-2030) Казанского (Приволжского) федерального университета. Финансирование работы осуществлялось при поддержке Российского научного фонда (№ 20-14-00166).

## АКТУАТОРЫ НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ ПОЛИМЕРОВ

А. В. Максимкин, Т. Дайюб, О. В. Филиппова, Д. И. Ларионов

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

✉ maksimkin\_a\_v@staff.sechenov.ru

### Аннотация

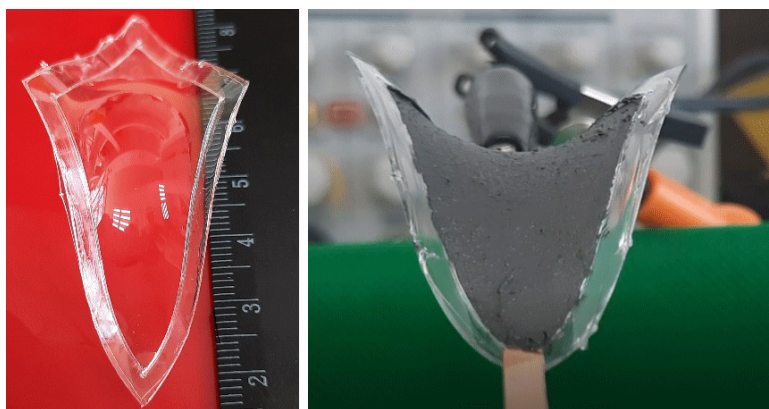
В работе представлены результаты разработки и исследований биомиметических устройств (актуаторы), способных выполнять движения, максимально приближенные к движению биологических мышц. Актуаторы выполнены на основе электроактивных полимеров и управляются путем приложения электрического поля.

Для улучшения качества жизни человека требуется разработка новых биомиметических материалов, которые по своей структуре имитируют природные материалы, имеют схожие механические свойства и выполняют необходимые функции. К таким материалам относятся биомиметические актуаторы, которые способны генерировать движения, максимально приближенные к движениям биологических мышц. Для создания подобных устройств наилучшим образом подходят полимерные материалы, которые могут контролируемо менять свои геометрические размеры под действием внешнего раздражителя. Биомиметические актуаторы могут применяться в разработке перекачивающих мембран при создании искусственного клапана сердца или в качестве высокоточных движителей для бионических протезов, различных датчиков, мягких и антропоморфных роботов. Также такие материалы могут быть использованы в реабилитационной медицине, например при создании различных массажеров и противопролежневых матрасов. Разрабатываются концепции, которые позволяют реализовывать такие актуаторы в качестве искусственных мышц, напрямую вживляемых в биологический организм.

К перспективным материалам для создания биомиметических актуаторов относятся электроактивные полимерные материалы, в частности эластомерные пленки на основе силикона, полиуретана и акрила. Эластомерные пленки являются диэлектриками, на поверхность которых с обеих сторон наносят тонкие эластичные электроды из углеродных материалов или металлов. Принцип работы таких биомиметических актуаторов на основе эластомерных диэлектриков заключается в следующем: при подаче постоянного напряжения на поверхности эластичных электродов скапливаются отрицательно и положительно заряженные заряды, которые под действием силы Кулона создают электростатическое давление, деформирующее эластомер. Таким образом, происходит преобразование электрической энергии в механическую. Разрабатывая дизайн искусственных мышц на основе электроактивных полимеров, можно добиваться генерирования необходимого типа движения: сжатия, расширения или изгиба, при этом отсутствует инерционность в движении. На рисунке представлен пример разработанного актуатора, который позволяет генерировать изгибающие движения под действием электрического поля.

Актуаторы на основе электроактивных полимеров могут порождать довольно большие деформации, которые способны достигать 400 %, обладают высокой скоростью срабатывания до 1000 Гц и высоким КПД. Развиваемые напряжения таких актуаторов при сжатии в несколько раз превышают таковые значения для биологических мышц.

В работе рассмотрены основные подходы по созданию биомиметических актуаторов, перспективы использования и существующие проблемы, ограничивающие их применение.



Актуатор на основе акрилового эластомера



**ПОИСК БАКТЕРИОФАГОВ, ЭФФЕКТИВНЫХ ПРИ БОРЬБЕ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА *PSEUDOMONAS* И *RAOULTELLA*, ПОРАЖАЮЩИХ КОК-САГЫЗ (*TARAXACUM KOK-SAGYZ* RODIN) — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА**

Л. Ю. Мартиросян<sup>1,2</sup>, А. Л. Лукьянова<sup>3</sup>, К. А. Мирошников<sup>4</sup>, А. Ю. Америк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ levon-agro@mail.ru

### Аннотация

Растение кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) — продуцент натурального каучука (НК). В настоящее время в связи с возрастающим спросом на НК кок-сагыз активно возделывается как его альтернативный источник [1, 2]. В процессе выращивания мы столкнулись с бактериозом у вегетирующих растений. В качестве инновационного решения произведен поиск бактериофагов, поражающих основные штаммы бактерий, характерные для данной культуры.

Цель данной работы — поиск бактериофагов, эффективных при борьбе с заражением кок-сагыза, и разработка препарата для обработки растений на их основе.

На первом этапе работы было необходимо получить чистую культуру потенциального патогена и идентифицировать ее. При высеве на питательную среду (триптон 10 г/д, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л, агар 15 г/л) пробы из зараженной ткани, взятой из растений с внешними признаками бактериоза, выделены потенциальные патогены Ksz1 и Ksz2.

Для идентификации патогена проведено секвенирование участка 16S рПНК с использованием стандартных праймеров (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'). Анализ данного участка позволяет идентифицировать культуру с точностью до рода. Дополнительно осуществлялось секвенирование участка бета-субъединицы гиразы *gyrB* (*gyrB*5': GGA GCA GTA CAT CAA GGA CGA, *gyrB*3': GGG TCC ATG GTG GTT TCC CAC A). Для большей точности секвенирования на концах участка ПЦР-продукт был предварительно клонирован в рAL2-Т вектор. Этот вектор представляет собой линейаризованную плазмиду с выступающими 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование обеспечивается способностью Taq-полимеразы нематрично добавлять на 3'-конец синтезируемой ДНК дезоксиаденозин.

Анализ последовательностей показал, что Ksz1 — *Pseudomonas putida*, Ksz2 — *Raoultella terrigena*.

Для чистых культур выделенных патогенов был проведен поиск бактериофагов стандартным методом с использованием накопительных культур. В качестве источника взяты сточные воды из очистных сооружений пос. Горки Ленинские, Ленинский район, Московская область. В результате для обеих культур найдены бактериофаги, успешно вызывающие лизис на бактериальном газоне. Бактериофаг против *Pseudomonas putida* условно назван PP1. Бактериофаг против *Raoultella terrigena* — RT1. На бактериальном газоне фаг PP1 формирует бляшки без ореола диаметром около 3 мм, а фаг RT1 — бляшки диаметром около 2 мм с ореолом примерно 1 мм.

Первичное тестирование действия смеси данных фагов на растениях с выраженными признаками бактериальной инфекции в аэропном фитотроне показало многообещающий результат и привело к прекращению развития симптомов гнили корневой системы, к индукции образования новых корней.

Таким образом, в рамках данной работы выделены бактериофаги для борьбы с бактериозом *Taraxacum kok-saghyz* Rodin и первично показана высокая эффективность их применения в аэропном фитотроне.

### Литература

1. Кутузова С. Н., Брач Н. Б., Конькова Н. Г., Гаврилова В. А. Кок-сагыз — *Taraxacum kok-saghyz* (Asteraceae, Compositae) — источник ценного растительного сырья для резиновой, пищевой и фармацевтической промышленности // Биосфера. 2015. Т. 7, № 4.
2. Uteulin K., Mukhambetzhonov S., Yesbolayeva B. et al. Introduction to *in vitro* culture of isolated *Taraxacum kok-saghyz* roots // Вестн. Казах. нац. ун-та. Серия биологическая. 2015. № 2. С. 37–42.

## ЭФФЕКТ ВНЕСЕНИЯ СПАВ НА ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА ПОЧВЕННОГО ТИПА

К. К. Мелконян<sup>1</sup>, Н. Н. Волченко<sup>2</sup>, А. А. Табачникова<sup>2</sup>, И. В. Супрун<sup>2</sup>, А. А. Самков<sup>2</sup>, А. А. Худокормов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кубанский государственный технологический университет Краснодар

<sup>2</sup>Кубанский государственный университет, Краснодар

✉ 010899karina@gmail.com

### Аннотация

Микробный топливный элемент (МТЭ) — устройство, которое преобразует химическую энергию в электрическую с помощью каталитической активности микроорганизмов. Одной из перспективных разработок в этой сфере является использование МТЭ в качестве биосенсора. Микроорганизмы чувствительны к широкому ряду факторов загрязнения окружающей среды, что делает их удобным компонентом аналитической системы.

В данном исследовании использовались конструкции МТЭ почвенного типа, представляющие с собой вертикальный пластиковый сосуд объемом 60 мл. Электроды размещались в нижней (бианод) и верхней (катод) частях почвенного слоя. Они были замкнуты в цепь с автоматическим вольтметром. Электрогенным сообществом в МТЭ служила естественная микрофлора 8 образцов почв и грунтов, отобранных в различных природных экотопах. В качестве токсиканта выбран додецилсульфат натрия (ДСН). Это соединение применяется в широком ряде моющих средств, но при этом микроорганизмы способны к биодegradации.

Внесение модельного раствора токсиканта, превышающее в 10 раз ПДК ДСН, привело к снижению электрогенеза в шести из восьми образцах почв в течение 15 суток опыта. В двух образцах после первичного падения напряжения с 440 до 100 мВ в случае с песком с Кольского залива и с 200 до 50 мВ в МТЭ с донными отложениями с реки Тулома на 10-е сутки начался рост биоэлектрохимической активности до показателей 220 и 100 мВ соответственно. Это позволяет предположить возможность ассимиляции СПАВ микробными сообществами дна водоемов и использования их в качестве топливного субстрата.

Выяснено, что в составе таких биоэлектрохимических систем, как МТЭ, все образцы почв так или иначе реагируют на появление СПАВ, но в разной степени. У некоторых образцов наблюдалось падение электрогенеза на 10–20 % с последующим колебанием в районе исходного уровня. Такая реакция обнаружена у образцов, чей электрогенез до внесения поллютанта был относительно не велик (менее 10 мВ). Некоторые почвы реагировали в виде сильного падения электрогенеза — наибольшее влияние токсиканта наблюдалось в образце чернозема: до внесения СПАВ вольтаж МТЭ составлял около 800 мВ, на пятые сутки после внесения напряжение уменьшилось на 95 %.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о потенциальной возможности применения подобных устройств в качестве основы для биосенсоров.

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАГРУЗКИ миРНК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ НАНОЧАСТИЦ

А. А. Мельникова<sup>1,2</sup>, Р. С. Киркин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии, Обнинск

<sup>2</sup>Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск

✉ angelik\_melnikova@mail.ru

### Аннотация

Научно-исследовательская работа посвящена изучению эффектов двух разных поверхностных модификаций кремниевых наночастиц на загрузку коротких РНК.

Важная цель молекулярно-генетических исследований — подавление экспрессии генов, отвечающих за развитие опухолей. Потенциальным способом снижения влияния этого фактора еще на стадии трансляции белка является РНК-интерференция. Это процесс подавления экспрессии генов, который осуществляется за счет малых интерферирующих РНК (миРНК), представляющих собой короткие РНК, связывающиеся с матричной РНК, тем самым ингибируя процесс трансляции.

Для проникновения миРНК в клетку-мишень необходимо разработать способ их транспортировки, контролируемый в пространстве и времени. Актуальное направление для решения этой проблемы — использование высокостабильных пористых наночастиц на основе кремния. Кремниевые наночастицы относятся к керамическим наноматериалам, наряду с наночастицами алюминия и титана. Чаще всего они изготавливаются из пористого материала и очень распространены как носители лекарственных средств при проведении противоопухолевой терапии [1]. Одной из ключевых проблем в нанометровых системах доставки препаратов является изготовление высокостабильных в физиологических условиях наноносителей, способных с высокой эффективностью инкапсулировать терапевтические агенты и управляемо высвобождать свою полезную нагрузку [2].

Одно из перспективных направлений для решения проблем эффективной доставки лекарств — использование пористых неорганических материалов на основе кремния. Функционализация наночастиц полиэтиленимином (PEI) и (2-аминоэтил)-3-аминопропилтриметоксисиланом (DAMO-P) позволяет напрямую взаимодействовать с раковыми клетками и эффективно проникать в их микроокружение, по сравнению с традиционными системами доставки.

Для проведения исследования по загрузке миРНК использовались мезопористые наночастицы размером 120 нм, полученные методами лазерной абляции и фрагментации в жидкости. Лазерная абляция в жидкости позволяет синтезировать новые ультрачистые наноматериалы (без побочных загрязнений), которые могут внести решающий вклад в биомедицинских применениях. Лазерно-синтезированные наноматериалы могут обладать практически нулевой токсичностью и быть биоразлагаемыми, не оставляя после себя никаких токсичных следов. Непосредственно перед экспериментами суспензии наночастиц подвергались ультразвуковой обработке для устранения образовавшихся в процессе хранения агломератов.

В текущем исследовании с целью увеличения функциональности наноносителей осуществлялась модификация их поверхности различными агентами (функционализация), обеспечивающими повышенную эффективность загрузки препарата и более равномерное его высвобождение. В ходе работы были синтезированы наночастицы, функционализированные полиэтиленимином (PEI) и (2-аминоэтил)-3-аминопропилтриметоксисиланом (DAMO-P). Продемонстрировано, что за счет функционализации наночастиц полиэтиленимином (PEI-pSi) достигнута более высокая эффективность загрузки миРНК на наночастицы кремния, что объясняется химическим связыванием миРНК и иминогруппы в составе PEI. В свою очередь, функционализация наночастиц 2-аминоэтил-3-аминопропил-триметоксисиланом (DAMO-pSi) позволила при ультразвуковой обработке загрузить более 90 % миРНК, что почти в 10 раз эффективнее, чем при обработке PEI.

### Литература

1. Дурнев А. Д. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине // Гигиена и санитария. 2014. № 2. С. 76–83.
2. Спивак Ю. М. и др. Морфология и свойства поверхности пористого кремния для адресной доставки лекарств // Вестн. Новгород. гос. ун-та. 2015. № 8 (91). С. 77–80.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ТРАНСГЛЮТАМИНАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS*\*Ю. А. Меркульева<sup>1,2</sup>, В. Н. Никитин<sup>1</sup>, А. А. Бондарь<sup>2,3</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово<sup>2</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ j.a.merkulyeva@gmail.com

**Аннотация**

Бактериальные трансглутаминазы (TGL, ЕС 2.3.2.13) активно используют в пищевой промышленности, медицине и исследовательской практике для внутри- и межмолекулярной сшивки белков. В данной работе впервые получена рекомбинантная трансглутаминаза *Bacillus thuringiensis* и установлено ее сходство с ферментом близкородственной бактерии *B. subtilis*.

Трансглутаминазы широко присутствуют в тканях и жидкостях организма животных, растений, грибов и дрожжей. Среди бактерий TGL-подобные белки обнаружены только у нескольких штаммов спорообразующих бактерий. Бактериальные TGL отличаются от ферментов млекопитающих и растений меньшим размером и однодоменной структурой и не нуждаются в кофакторах для активации. На сегодняшний день коммерчески доступен только препарат TGL из *Streptomyces mobaraensis*. Другие перспективные ферменты обнаружены у бактерий рода *Bacillus*. Наиболее изучена TGL *B. subtilis*. Фермент синтезируется в активной форме и представляет собой небольшой однодоменный белок, который вырабатывается во время спорообразования и сшивает поверхность споры. Привлекательным выглядит поиск ферментов, обладающих более ценными технологическими свойствами, и у других представителей рода *Bacillus*. В данном исследовании мы оценили возможность выделения TGL из близкородственной бактерии *B. thuringiensis*.

Фрагмент гена *TGL*, кодирующий трансглутаминазу, получали в ПЦР с помощью пары праймеров TG-Btur\_548F (5'-cctgtacaaggtcctgaagatg-3') и TG-Btur\_1605R (5'-gatctcattgcaatgtgacca-3') на матрице геномной ДНК *B. thuringiensis* ssp. *ostrinae* 941/H8ac из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Эту последовательность секвенировали по методу Сенгера и анализировали с помощью программы BLAST. Анализ подтвердил, что н. п. принадлежит таксону *B. cereus* group и кодирует TGL (276 а.о.), имеющую высокий процент идентичности с TGL *B. subtilis*. Затем на основе вектора рНТ255 сконструировали вектор для продукции белка в клетках *B. subtilis*. Последовательность *TGL* амплифицировали с введением н. п. *His*-тэга в С-конец белка и встраивали в вектор рНТ255 в ОПТ с сигнальной последовательностью *Epr* или без нее, подтверждение структуры рНТ255-*Epr*-*TGL* и рНТ255-*TGL* проводили секвенированием.

При электропорации клеток *B. subtilis* WB800N пДНК и последующей индукции ИПТГ продукция белка не наблюдали. Решено использовать в качестве продуцента клетки *E. coli*. Для этого последовательность *TGL* субклонировали в вектор рЕТ21a по сайтам гидролиза *Vam*HI и *Sal*I. Полученной конструкцией провели трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3). Единичные клоны культивировали в среде LB и проводили индукцию синтеза белка в присутствии 1 мМ ИПТГ.

При электрофорезе в ДСН-ПААГ TGL с молекулярной массой ~ 33 кДа, соответствующей расчетной, обнаружена в нерастворимой фракции бактериальных белков. Для выделения белка тельца включения разрушали УЗ-деинтеграцией в присутствии 8 М мочевины. Затем проводили Ni-аффинную хроматографию и рефолдинг белка путем ступенчатого диализа против PBS. Для последующей проверки активности фермента синтезировали субстрат Z-Gln-Gly и подобрали условия гидроксаматного анализа с использованием стандарта TGL. Из генетического разнообразия *B. thuringiensis* из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор» выбраны еще 9 вариантов фермента, отличающихся по аминокислотной последовательности, для дальнейшего изучения.

\* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ FZMW-2020-0002) — «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия».

© Ю. А. Меркульева, В. Н. Никитин, А. А. Бондарь, Д. Н. Щербаков, 2022

## СОЗДАНИЕ БИПАРАТОПНЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ ErbB3

А. Д. Микушина<sup>1</sup>, И. Е. Елисеев<sup>1-3</sup><sup>1</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет  
им. Ж. И. Алферова РАН, Санкт-Петербург<sup>2</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ annamikushina303@gmail.com

**Аннотация**

Для блокирования рецептора ErbB3 при Her2-ассоциированном раке молочной железы реализованы две концепции создания бипаратопных антител. Получен химерный белок, в котором однодоменные антитела к различным эпитопам эктодомена ErbB3 соединены последовательно. В качестве альтернативной стратегии антитела были модифицированы и соединены при помощи CuAAC клик-химии, что позволило оставить оба N-конца нативными. Полученные бипаратопные антитела реализуют новый подход к анти-ErbB3 иммунотерапии.

К препаратам, используемым для лечения Her2-ассоциированного рака молочной железы, у большинства пациентов развивается резистентность. Поскольку рецептор ErbB2 (Her2/Neu) проявляет функциональную активность только в паре с другими рецепторами, относящимися к данному семейству, для подавления пролиферации раковых клеток исследуют блокирование его партнеров. При инактивации рецептора ErbB2 происходит увеличение экспрессии, сигнальной активности и изменение локализации рецептора ErbB3 из цитозоля на цитоплазматическую мембрану. Интерес к блокированию ErbB3 остается высоким [1], и несколько препаратов находятся на разных стадиях клинических испытаний [2].

Одной из технологий таргетной иммунотерапии являются однодоменные антитела (VHH, или наноантитела) из семейства верблюдовых, лишённые легкой цепи и константного участка тяжелой. Наноантитела обладают высокой физико-химической стабильностью и гидрофильностью, что обеспечивает растворимость и эффективный фолдинг при их экспрессии в бактериальных штаммах и дрожжах. А увеличенный гипервариабельный участок CDR H3 позволяет распознавать скрытые антигенные сайты. Помимо этого, малый размер позволяет быстрее проникнуть в ткани.

В данной работе рассматриваются два однодоменных антитела BCD090-P1 и BCD090-M2, продемонстрировавшие высокую аффинность к внеклеточному домену рецептора ErbB3. Ранее у данных антител была изучена термодинамическая стабильность [3] и структура вариабельного фрагмента [4]. При исследовании терапевтических свойств однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2 установлено, что данные антитела связывают различные эпитопы и реализуют различные механизмы блокирования активации ErbB3 [5]. В данной работе осуществляется идея создания бипаратопного антитела, состоящего из 2 наноантител BCD090-P1 и BCD090-M2. Предполагаем, что аффинность к рецептору бипаратопного антитела будет выше за счет бивалентности. Помимо этого, проявится синергия в блокировании различных механизмов активации рецептора, а следовательно, и в ингибировании клеточного роста рака молочной железы.

Для создания бипаратопного антитела реализовано два подхода. Первый — создание генетической конструкции, содержащей последовательность из двух однодоменных антител, разделенных глицин-сериновым линкером, который обеспечивает гибкость белка. Новая генетическая конструкция создана с помощью ПЦР и ферментов рестриктаз и лигаз.

Во втором случае — выполнение генетической модификации имеющихся плазмид дополнительным цистеином на С-конце белка для последующего объединения антител с помощью реакции клик-химии. Вставка дополнительной аминокислоты выполнялась с помощью QuickChange PCR.

Все сконструированные плазмиды трансформированы в экспрессионный штамм *E. coli Shuffle*. Оптимизация условий показала, что наилучшая экспрессия проходит в течение 16 ч при 30 °С в присутствии 0,02 % рамнозы. Белки очищены с помощью аффинной хроматографии на колонке IMAC. Конечный диапазон концентраций составил 3–8 мг/мл.

Таким образом в ходе работы получены три генетические конструкции: pSol-SUMO P1-GS-M2, pSol-SUMO P1-Cys, pSol-SUMO M2-Cys, последовательности модификаций которых подтверждены с помощью секвенирования. Оптимизированы условия гетерологической экспрессии белков и проведена хроматографическая очистка белков.

Полученные белки являются новым альтернативным способом для таргетирования рецептора ErbB3, и в дальнейшем планируется изучение их физико-химических и терапевтических свойств.

**Литература**

1. Mishra R. HER3 signaling and targeted therapy in cancer // *Oncol. Rev.* 2018. № 12.
2. Dolgin E. et al. HER3-addicted tumors: how biotechs are closing in // *Nat. Biotechnol.* 2022. № 40.
3. Eliseev I. E. et al. Thermodynamic Analysis of the Conformational Stability of a Single-Domain Therapeutic Antibody // *Tech. Phys. Lett.* 2017. № 12 (43).
4. Eliseev I. E. et al. Crystal structures of a llama VHH antibody BCD090-M2 targeting human ErbB3 receptor // *F1000Research.* 2018. Vol. 7.
5. Eliseev I. E. et al. Targeting ErbB3 Receptor in Cancer with Inhibitory Antibodies from Llama // *Biomedicines.* 2021. Vol. 9.

## БИОСЕНСОР НА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОЛНАХ В ОДНОМЕРНОМ ФОТОННОМ КРИСТАЛЛЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С БЕЛКАМИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ \*

Т. В. Митько<sup>1,2</sup>, А. М. Белова<sup>1</sup>, А. Г. Матвеева<sup>1,2</sup>, Д. В. Басманов<sup>1</sup>, Д. В. Клинов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ TatianaM2295@gmail.com

### Аннотация

Поиск новых стратегий борьбы с резистентными микроорганизмами на сегодняшний день является отдельной большой областью исследований. Немаловажную роль играет изучение связывания бактерий и потенциальных противобактериальных препаратов; кинетики процессов на их поверхности; механизмов воздействия лекарственных препаратов (ЛП) на них. С помощью микрофлюидного безмаркерного биосенсора на поверхностных волнах в одномерном фотонном кристалле (ОФК) можно отказаться от введения химических меток в исследуемое вещество, что позволяет ему стать эффективным инструментом изучения взаимодействия новых ЛП с мембраной бактериальных клеток. В данной работе показана возможность детекции сорбции белков и пептидов на внешнюю поверхность бактериальных клеток на примере *E. Coli BL21DE* с применением ОФК-биосенсора.

Исследование бактерий играет важную роль в различных сферах нашей жизни, начиная от поиска новых методов лечения бактериальных инфекций, в том числе преодоления их устойчивости к антибиотикам, и заканчивая использованием культур бактерий в биотехнологии.

Детекция взаимодействия бактериальных клеток и биомолекул, как правило, осуществляется с помощью различных химически присоединенных меток. Такие метки могут приводить к изменению конформации исследуемого соединения и менять его активность, кинетику и механизм взаимодействия с бактериальной клеткой. Данная проблема особенно актуальна в случае низкомолекулярных соединений, для которых метка сопоставима по размерам с их активным центром. Использование ОФК-биосенсора позволяет отказаться от введения меток и проанализировать широкий диапазон взаимодействий: от образования белок-белковых комплексов до связи бактериальных клеток с различными лигандами.

Альтернативой существующим антибиотикам могут стать антимикробные пептиды (АМП), являющиеся компонентом врожденной иммунной системы. АМП нарушают целостность мембраны бактериальной клетки, приводя к ее гибели. Возможность развития резистентности к АМП ограничена, так как это требует структурных изменений в клеточной мембране [1].

Многие АМП сейчас проходят доклинические и клинические испытания в качестве противомикробных и противовоспалительных средств для терапевтического применения, число новых соединений быстро растет [2].

В данной работе мы изучали процесс сорбции белков и пептидов на поверхность бактериальных клеток в реальном времени. Рабочей поверхностью биосенсора является ОФК [3]. Над его предварительно модифицированной поверхностью [4] последовательно пропускаются исследуемые растворы. Взаимодействие лигандов с поверхностью ОФК и между собой вызывает изменение параметров возбуждения поверхностных волн. Отслеживание изменения этих параметров позволяет получить сорбционные кривые, которые отображают взаимодействие бактериальных клеток *E. Coli BL21DE* с двумя АМП. Контрольные эксперименты проведены с флуоресцентно меченым конканавалином А. С помощью флуоресцентной метки можно проконтролировать специфичность связывания белка именно с поверхностью бактерий. Жизнеспособность бактериальных клеток при данном методе их иммобилизации сохраняется.

Разработанная методика позволяет исследовать взаимодействие антимикробных препаратов с мембраной бактериальных клеток.

### Литература

1. Lohner K., Hilpert K. Antimicrobial peptides: Cell Membrane and Microbial Surface Interactions // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. Vol. 1858 (5). P. 915–917.
2. Grafskaja E., Pavlova E., Babenko V. V. et al. The *Hirudo Medicinalis* Microbiome Is a Source of New Antimicrobial Peptides // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21(19). P. 7141.
3. Konopsky V. N., Karakouz T., Alieva E. V. et al. Photonic crystal biosensor based on optical surface waves // *Sensors*. 2013. Vol. 13. P. 2566–2578.
4. Morozova O. V., Levchenko O. A., Cherpakova Z. A. et al. Surface modification with polyallylamines for adhesion of biopolymers and cells // *Int. J. Adhesion Adhesives*. 2019. Vol. 92. P. 125–132.

\* Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №18-32-00797).

## ТВЕРДОФАЗНАЯ ПЦР НА ПОЛИМЕРНОЙ ПОДЛОЖКЕ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ РЕГИСТРАЦИЕЙ\*

Р. А. Мифтахов, А. Ю. Иконникова, А. В. Чудинов

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

✉ mr.miftahov20@yandex.ru

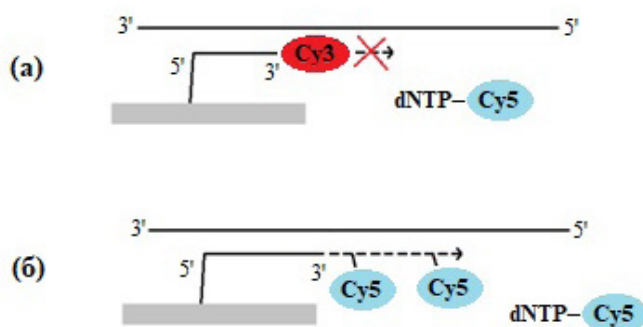
### Аннотация

Изучен подход проведения твердофазной ПЦР на полимерной подложке с микроячейками из «щеточного» полимера. В качестве анализируемых фрагментов ДНК использовали праймеры, специфичные участку последовательности 7-го экзона гена АВО человека. Элонгацию ДНК-зондов подтвердили методом флуоресцентной микроскопии.

Твердофазная полимеразная цепная реакция (ПЦР) на чипе — перспективный метод параллельной специфической идентификации нуклеиновых кислот в биологических образцах, поскольку массив микроячеек позволяет иммобилизовать множество фрагментов ДНК и сводит к минимуму эффект перекрестного загрязнения.

В данной работе для иммобилизации ДНК-праймеров и проведения твердофазной ПЦР на чипе в качестве микроячеек использовали «щетки» из полиакриловой кислоты (ПАК). Ячейки из «щеточного» полимера были сформированы на полимерной пленке из циклического олефинового сополимера методом свободной радикальной полимеризации «от поверхности». Одноцепочечные ДНК-зонды, специфичные к участку последовательности 7-го экзона гена АВО человека, связывали с полимерными щетками по карбоксильным группам. ДНК-праймеры получены с помощью ДНК-синтезатора, прямой праймер: 5' NH<sub>2</sub>-ACA TGG AGT TCC GCG ACC AC-Cy3 3', 5' NH<sub>2</sub>-ACA TGG AGT TCC GCG ACC AC 3'; обратный праймер: 5' CCG GCG CTC GTA GGT GAA 3'. Присоединение аминокислотных праймеров на ПАК достигнуто предварительной активацией карбоксильных групп в присутствии N-гидроксисукцинимид и N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимида. Иммобилизацию ДНК-праймеров изучали с помощью флуоресцентной микроскопии на канале Cy3. Для проведения ПЦР на чипе в закрытую камеру биочипа влили ПЦР-раствор объемом 30 мкл, затем подготовленный биочип поместили на термоциклер РТС-100. В состав реакционной смеси (30 мкл) входили: Taq-полимераза (1 ед.), буфер, набор dNTP (200 мкМ) и Cy5-dUTP (8 мкМ), прямой и обратный праймеры, фрагмент человеческой геномной матрицы. Реакцию проводили при следующих условиях: 95 °С — 5 мин; 35 циклов: 95 °С — 20 с, 64 °С — 30 с, 72 °С — 40 с, далее 72 °С — 5 мин.

После окончания реакции тщательно отмыли все компоненты реакции. Контроль элонгации иммобилизованных праймеров осуществляли по встраиванию в растущую цепь флуоресцентно-меченных Cy5-dUTP (см. рисунок).



Твердофазная ПЦР на чипе: отсутствие элонгации иммобилизованного праймера, флуоресцентная метка Cy3 препятствует встраиванию dNTP (а), элонгация свободного 3'-конца иммобилизованного праймера (б)

После ПЦР на чипе наблюдали флуоресцентные сигналы на канале Cy5 по праймерам без метки на 3'-конце и отсутствие сигналов по праймерам с меткой Cy3, следовательно, краситель ингибирует полимеразную активность. В пустых ячейках также отсутствовали сигналы по красителю Cy5, что подтверждает специфичность ПЦР на чипе. Соотношение сигнала к фону составило 13,6/1.

Высокая емкость и доступность ДНК-зондов «щеточного» биочипа представляет интерес в разработке экономически выгодной и производительной системы мультиплексной ПЦР, предназначенной для обнаружения большого количества клинически важных последовательностей ДНК.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 20-14-00287).



## ИНГИБИТОРЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ БАКТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

А. В. Моисеева

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

✉ sasha.moiseeva.03@gmail.com

### Аннотация

В настоящее время известно, что межклеточная коммуникация бактерий имеет множество приспособительных механизмов, в особенности явление «чувство кворума» (*Quorum sensing*). Его механизм играет огромную роль в формировании биопленок, которые являются формой существования микробных сообществ и обеспечивают устойчивость к антибактериальным препаратам.

### Материалы и методы

Осуществлялся поиск публикаций 2000–2020 гг. в базах данных *PubMed*, *Scopus*, *Web of Science* по запросам: *Quorum sensing*, *Quorum sensing AND inhibitors*, *Quorum sensing AND biofilm AND antibiotic* и др. Включены оригинальные статьи, метаанализы, систематические обзоры, соответствующие выбранной теме.

### Результаты

*Quorum sensing*, или «чувство кворума», обозначает способность некоторых микроорганизмов к общению посредством специфических сигнальных молекул, необходимых для координации действий членов сообщества. Последнее обеспечивается только при определенной плотности популяции, когда концентрация сигнальных молекул достигает порогового значения.

Особое значение для врачей имеет способность некоторых бактерий под контролем «чувства кворума» образовывать биопленки. Они состоят из микробных клеток и внеклеточного матрикса, который содержит полисахариды, белки и ДНК. На этапе формирования зрелой биопленки среди микробных клеток выделяется популяция клеток-персистеров, устойчивых к антибиотикам. Благодаря горизонтальному переносу генов в бактериальной популяции антибиотикорезистентность приобретают все клетки, входящие в состав зрелой биопленки. В качестве одного из ключевых регуляторов биопленкообразования можно выделить *Quorum sensing*.

Межклеточная коммуникация бактерий включает следующие этапы: 1) продукция сигнальной молекулы; 2) распространение этих молекул в бактериальной популяции и при достижении пороговой концентрации связывание с рецепторами; 3) ответная реакция на поступающий сигнал, выражающаяся в активации транскрипции определенных генов. Каждый из этапов межклеточной коммуникации бактерий можно прервать, подобрав соответствующие ингибиторы. В первом случае в качестве ингибитора может выступать соединение, влияющее на путь биосинтеза сигнальной молекулы (например, триклозан). Во втором случае можно найти фермент, который будет разрушать сигнальные молекулы в окружающей среде, что нарушит распространение «сигнала» между бактериями. В третьем случае можно выбрать конкурентный ингибитор, который будет связываться со специфическим рецептором сигнальной молекулы. Вследствие прерывания межклеточной коммуникации бактерий нарушается процесс формирования биопленок. Это может быть одним из способов решения проблемы антибиотикорезистентности, которая в настоящее время очень распространена.

### Выводы

Изучение механизма *Quorum sensing* в последнее время становится все более актуальным, так как обнаружено его влияние на формирование биопленок, а также антибиотикорезистентности. «Антикворумные препараты» в скором времени смогут стать полноценной заменой антибиотиков, так как они направлены на ингибирование передачи сигнала между бактериальными клетками.

**ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ КОРНЕЙ *HAIRY ROOTS* КОК-САГЫЗА (*TARAXACUM KOK-SAGHYZ* R.)  
И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СУЛЬФАТОВ МЕДИ И ЦИНКА НА РОСТ БИОМАССЫ КОРНЕЙ,  
СОДЕРЖАНИЕ КАУЧУКА И ИНУЛИНА \***

Е. Р. Мягкова<sup>1</sup>, Л. Ю. Мартиросян<sup>1,2</sup>, Ю. Ц. Мартиросян<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

✉ levon-agro@mail.ru

**Аннотация**

Кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz*) — перспективный альтернативный каучуконос, ранее выращиваемый в промышленных масштабах на территории России [1]. Для увеличения рентабельности культуры применяются разные биотехнологические подходы [2]. С целью изучения биосинтеза каучука в корнях, в частности зависимости от компонентов минерального питания, получена культура корней с фенотипом *hairy roots*.

Проведена агробактериальная трансформация свободных от фитопатогенов *in vitro* растений кок-сагыз двумя способами. Использовали штамм агробактерий *Rhizobium rhizogenes* 15834 с устойчивостью к канамицину. Культуру наращивали в течение 12 ч до OD<sub>600</sub> 0,5, осаждали бактерии центрифугированием, добавляли ацетосинрингон. В качестве эксплантов применяли листовые пластинки кок-сагыз с черешками.

Первый способ трансформации заключался в кокультивации эксплантов с поранениями в агробактериальной суспензии, второй — с помощью вакуумной инфльтрации. Далее листовые пластинки пересаживали на селективную среду, содержащую антибиотики канамицин и цефотаксим для элиминирования бактерий, а также фитогормоны для получения каллусной культуры. Пересадка на свежую среду с уменьшенным содержанием антибиотиков проводилась каждые 7 суток. Первые признаки каллусогенеза зафиксированы спустя 3 недели. Через месяц получили корни, которые затем пересадили на жидкую среду QL без содержания антибиотиков и регуляторов роста.

Для подтверждения наличия *rol*-генов использовали ПЦР-анализ. На основании результатов ПЦР рассчитана эффективность трансформации, а также отобраны трансформированные линии корней, с которыми и продолжилась дальнейшая исследовательская работа. Эффективность трансформации методом кокультивации составила 21,4 %, при помощи вакуумной инфльтрации — 32,2 %.

Для изучения ростовых характеристик полученных трансформированных корней цикл культивирования составлял 70 суток. Трансформированные корни кок-сагыз при культивировании в колбах за 35–49 суток накапливали биомассу, в 89 раз большую по сравнению с исходным корнем, а также каучук и инулин до 9,8 и 14,6 % соответственно.

Для исследования влияния ионов металлов на накопление каучука и инулина использовали различные соединения меди и цинка. При культивировании *hairy roots* в жидкую среду культивирования QL добавлены сульфаты меди и цинка в повышенных концентрациях (см. таблицу).

**Влияние сульфатов меди и цинка на прирост корневой массы и содержание каучука и инулина у культуры корней кок-сагыз *hairy roots* на 35-е сутки культивирования**

Вариант	Сырой вес корней, г	Содержание каучука, %	Содержание инулина, %
1 Контроль: CuSO 0,025 мг/л ZnSO <sub>4</sub> 8,6 мг/л	10,9 ± 1,9	5,5 ± 0,2	7,3 ± 0,2
2 CuSO <sub>4</sub> 0,05 мг/л	14,0 ± 1,3	6,7 ± 0,2	8,1 ± 0,3
3 CuSO <sub>4</sub> 0,1 мг/л	9,2 ± 0,9	5,2 ± 0,1	7,1 ± 0,3
4 ZnSO <sub>4</sub> 17,2 мг/л	6,8 ± 0,6	2,9 ± 0,2	8,5 ± 0,2
5 ZnSO <sub>4</sub> 34,4 мг/л	5,1 ± 0,5	2,7 ± 0,1	9,2 ± 0,3

По данным таблицы, увеличение концентрации ионов меди и цинка в 2 и 4 раза по сравнению с оптимизированной по составу средой QL в основном подавляло ростовые процессы трансформированных корней кок-

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ (проект № 20-316-90032/20).

© Е. Р. Мягкова, Л. Ю. Мартиросян, Ю. Ц. Мартиросян, 2022

---

сагыза, кроме варианта с 2-кратным повышением сульфата меди. Также в варианте № 2 наблюдалось одновременное увеличение содержания каучука и инулина. При добавлении сульфата цинка в вариантах № 4 и 5 содержание каучука было меньше по сравнению с контролем, но возросло содержание инулина.

#### **Литература**

1. Америк А. Ю., Мартиросян Ю. Ц., Мартиросян Л. Ю. и др. *Parthenium argentatum* A. Gray, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse как альтернативные источники натурального каучука: нужны ли они нам? // С.-х. биология. 2022. Т. 57, № 1. С. 3–26.
2. Salehi M., Cornish K., Bahmankar M. et al. Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of *Taraxacum kok-saghyz* // Ind. Crops and Prod. 2021. Vol. 170. P. 113667.

## DEVELOPMENT OF AN IMPLANTABLE YEAST-BASED BIOSENSOR FOR MONITORING OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN SALMONIDS\*

A. A. Nazarova, E. V. Madyarova, Y. A. Rzhechitskiy, E. S. Shishkina,  
A. N. Gurkov, P. B. Drozdova, E. V. Borvinskaya, M. A. Timofeyev

*Irkutsk State University*

✉ annazarova1995@gmail.com

### Abstract

In this work, we started the development of an implantable yeast-based biosensor for monitoring of the tetracycline antibiotics in salmonid fishes. We showed that the adipose fin is highly transparent and favors using red fluorescent proteins as reporters. Rigid polyacrylamide gels prevent yeast from leaving the carrier and ensure high survival of the cells for at least 10 days. Finally, the constructed yeast strain expressing mScarlet-I under the tetracycline-inducible promoter showed quantitative response to the antibiotics.

Real-time monitoring of antibiotics in animal blood may be one of the ways to choose the optimal therapeutic dose depending on the physiological status of an individual. Implantable optical sensors are a promising tool for such tasks, but selectivity of existing sensors to complex molecules like antibiotics is usually limited. At the same time, a wide set of yeast-based sensors with high selectivity have already been developed for *in vitro* analyses, and some of them are made specifically to antibiotics [1]. However, yeast has not been tested as a possible sensitive component of implantable sensors. The aim of this work was to estimate the feasibility of developing a yeast-based implantable optical sensor for the tetracycline monitoring in animals.

Fluorescent proteins are suitable reporter genes for such application of yeast, but their fluorescence is relatively weak and may be hardly detectable under animal skin. Some salmonid fishes, including widely farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), possess highly translucent adipose fin, which we decided to use for initial tests. We compared transmission spectra of adipose fin and skin of rainbow trout and found that the fin indeed absorbs much less visible light starting from approximately 440 nm. The adipose fin transparency was especially high for green and red light, and thus red fluorescent proteins are preferable for application in the fin.

Yeast cells require a biocompatible carrier in order to prevent their possible distribution within the animal body and also to hide the microorganisms from the immune system. Polyacrylamide hydrogels were previously suggested as a possible scaffold for yeasts [2], and here we tested these hydrogels with different density. Yeast cells were able to leave amorphous low-density gels within several days, while rigid gels with density from 5 % kept these microorganisms anchored. Moreover, median mortality of yeasts in such hydrogels (incubated in culture medium) did not exceed 20 % during 10 days. Thus, immobilization of yeast in polyacrylamide hydrogel is a possible option for development of implantable biosensors.

We modified yeasts with a pCM252-based plasmid encoding the red fluorescent protein mScarlet-I under the tetracycline-inducible promoter [3]. Visualization under a fluorescent microscope showed quantitative synthesis of mScarlet-I in response to tetracycline (1–5 mg/L) and weaker response to oxytetracycline (5 mg/L) after 24 h. The obtained data demonstrate the feasibility of developing a safe implantable biosensor for monitoring the level of tetracycline antibiotics in the body of salmonid fishes.

### References

1. Miller R. A., Brown G., Barron E. et al. Development of a paper-immobilized yeast biosensor for the detection of physiological concentrations of doxycycline in technology-limited settings // *Anal. Methods*. 2020. Vol. 12, № 16. P. 2123–2132.
2. Calinescu I., Corina T., Petre C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in polyacrylamide hydrogel obtained at low temperature // *Romanian Biotechnol. Lett.* 2012. Vol. 17. P. 7628–7638.
3. Bellí G., Garí E., Piedrafitá L. et al. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26, № 4. P. 942–947.

\* This study was supported by the Russian Science Foundation grant (№ 20-64-47011).

## ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА ГРИБКОВОЙ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ В ПРОМЫШЛЕННО ЦЕННЫХ ДРОЖЖАХ *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Д. А. Наумова<sup>1,2</sup>, М. И. Котлов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ adidasha99@gmail.com

### Аннотация

С целью изучения влияния синтетических сигнальных последовательностей различных организмов на уровень секреции фермента  $\alpha$ -амилазы и ее активности в клетках дрожжей отобраны и оптимизированы сигнальные пептиды 10 различных организмов и заклонированы в клетки *Kluyveromyces lactis*. По результатам исследования 8 из 10 сигнальных пептидов показали увеличение активности за счет роста объема целевого фермента, самым активным вариантом стала синтетическая сигнальная последовательность гена люциферазы из организма *Gaussia princeps*.

Альфа-амилаза — гидролитический фермент, который расщепляет крахмал и гликоген до моно- и дисахаридов (мальтозы, глюкозы). Шифр КФ — 3.2.1.1. Данный фермент широко применяется в пищевой, ферментационной и фармацевтической промышленности и др. [1]. Дрожжи *K. lactis* являются перспективными продуцентами в качестве альтернативной системы экспрессии дрожжей, так как имеют международный GRAS-статус, способны расти на дешевых отходах молочного производства, а уровень экзопротеаз достаточно низкий.

Для кодоновой оптимизации белка альфа-амилазы выбран штамм *Aspergillus oryzae* (#BKPM F55), так как у этого рода грибов фермент продуцируется во внеклеточное пространство в виде мономера и имеет оптимум работы в подходящей для производства температуре и кислотности среды (40–60 °С, pH 4,5–5,5). Для поиска подходящего штамма-донора использовалась база данных *Brenda.org* (табл. 1).

Таблица 1

Подобранные сигнальные пептиды и лидерные последовательности

Вид	Ген	Аминокислотная последовательность	Номер образца
<i>Saccharomyces fibuligera</i>	SfGLU1	MKFGVLFVFAAIVSALPA	82
<i>Trihoderna reesei</i>	(cbh1)	MYRKLAVISAFLETARAQSA	77
<i>Gaussia princeps</i>	(GLuc)	MKM16E (mutagenesis)	80
<i>K.marxianus mut. opt.</i>	(INU1)	MKLAYSLLLPLAGVSA	79
<i>K. lactis</i>	Killer toxin sub a	MNIFYIFLFLLSFVQG	71
<i>Arxula adenivorans</i>	glucoamilase	MREFLALAAAASIAVADSCH	75
<i>Neocallimastix frontalis</i>	(xyn3)/	MNIFYIFLFLLSFVQG	74
<i>Kl. lactis</i>	(INU1)	MLKLLSLVPLASAAVIHRR	78
<i>Kl. lactis</i>	Alpha-MF wt	MKFSTILAASTALISVVMAPVSTETDIDDLPIVPEEALIGFIDLTG DEVSLLPVNGTHTGILFLNTTIAEAAFADKDDLKREADA	67
<i>Kl. lactis</i>	Alpha-MF optimized	MKFSTILAASTALISVVMAPVSTETDIDDLPIVPEEALIGFIDLTG DEVSLLPVNGTHTGILFLNTTIAEAAFADKDDLKREADA	68

Перед трансформацией сконструированным эписомальным вектором на основе pKD1 [2], содержащей ARS, маркер и ген интереса дрожжи выращивали при 30 °С в среде YP с добавлением 2 % глюкозы и 1 % сорбитола. Количество клеток было выровнено по оптической плотности, в качестве бланка использовалась среда для культивирования YP. Активность амилазы определялась с помощью связанного ферментативного анализа, который приводит к получению колориметрического (405 нм) продукта, пропорционального количеству субстрата, ethylidene-pNP-G7, расщепленного амилазой. Одна единица активности амилазы представляет собой количество амилазы, которое расщепляет ethylidene-pNP-G7 для получения 1,0 мкмоль п-нитрофенола в минуту при 25 °С (табл. 2, рис. 1).

Таблица 2

## Показатели активности

Номер образца	Количество нитрофенола, нмоль	Активность фермента, нмоль/мин/мл
71	6,4	76,8
74	10,1	121,2
75	5,85	70,2
77	0,67	8,04
78	14,56	174,2
79	6,6	79,2
80	20	240
82	7,9	94,8
67	0,32	3,84
68	8	96

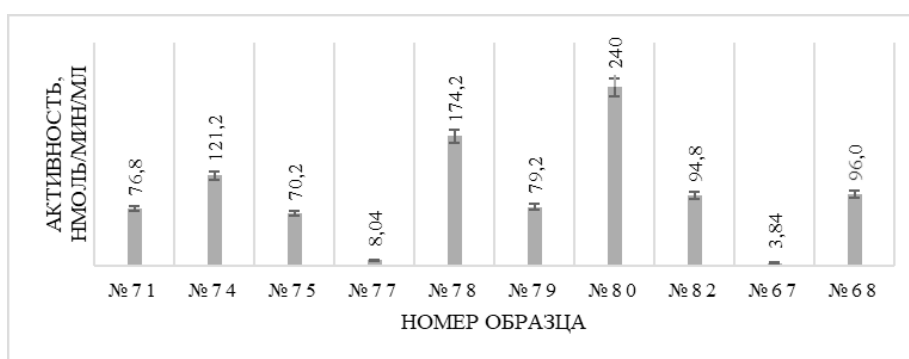


Рис. 1. Сравнение активности по образцам

Далее проанализировали количество белка в образцах с помощью SDS в ПААГ, выявлена разница в количестве целевого фермента. В качестве референса использовался БСА 100 нг/дорожка (рис. 2).

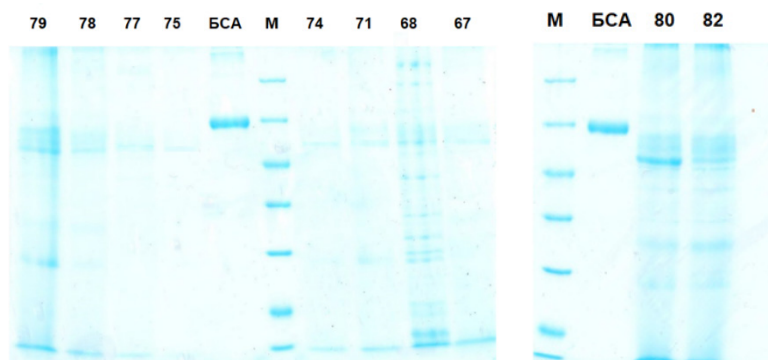


Рис. 2. Окрашенный белок из внеклеточного пространства культур с различными типами сигнальных пептидов в ПААГ

Также произведена проверка активности экспрессии гена альфа-амилазы из всех вариантов образцов посредством от-ПЦР в сравнении с геном домашнего хозяйства (рис. 3).

**Выводы**

Кодоновая оптимизация увеличивает выход белка. Оптимизированный фермент без изменения лидерного пептида дал больший выход и был активнее по сравнению с диким типом гена и сигнального пептида и оптимизированного гена фермента.

Выявлен самый эффективный сигнальный пептид из ряда исследуемых: оптимизированный синтетический ген лидерной последовательности люциферазы из *Gaussia princeps*.

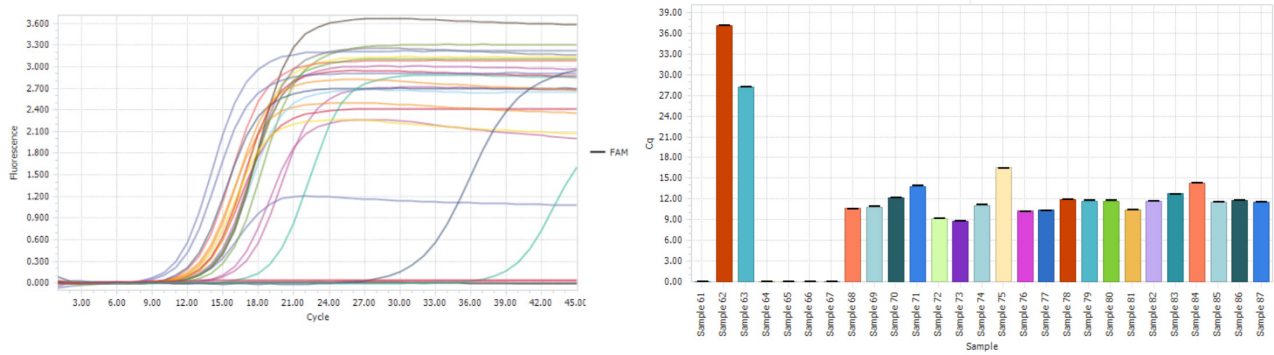


Рис. 3. Кривые плавления qRT-PCR и показатели  $C_t$

### Литература

1. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H. et al. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective // Process Biochem. 2003. Vol. 38. P. 1599–1616.
2. Bianchi M. M., Santarelli R., Frontali L. Plasmid functions involved in the stable propagation of the pKD1 circular plasmid in *Kluyveromyces lactis* // Curr. Genet. 1991. Vol. 19. P. 155–161.

## КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ НЕК293Т-BirA ДЛЯ ПРОДУКЦИИ БИОТИНИЛИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ\*

В. Н. Никитин, Ю. А. Меркульева, Д. Н. Щербаков

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ nikitin\_vn@vector.nsc.ru

### Аннотация

Разработана трансгенная клеточная линия НЕК293Т-BirA, содержащая ген биотин-лигазы BirA, и апробирован метод продукции *in vivo* биотинилированных секретируемых белков на примере иммунодоминантных белков патогенных для человека ортопоксвирусов.

Взаимодействие между авидином/стрептавидином и биотином — одно из самых сильных и специфических взаимодействий биологических молекул. Эта пара широко применяется в качестве «метки» для обнаружения, маркировки и иммобилизации белковых молекул. Разработаны методы химического биотинилирования, а также ферментативного *in vivo* и *in vitro* биотинилирования белковых молекул. Наиболее популярным остается метод *in vivo* биотинилирования рекомбинантных белков в клетках *E. coli* с помощью биотин-лигазы BirA, узнающей специфическую последовательность Avi-тега. Метод более 20 лет активно используется в молекулярной биологии и биотехнологии, однако такой подход не является широко распространенным в случае клеток млекопитающих.

Цель данной работы — получение стабильной клеточной линии для продукции рекомбинантных белков с биотиновой меткой на основе клеток НЕК293Т.

На первом этапе на основе оригинального вектора pVEAL, применяющего систему *Sleeping Beauty*, получен плазмидный вектор pVEAL-BirA, содержащий нуклеотидную последовательность BirA. Для выделения трансгенной клеточной линии проводили трансфекцию клеток НЕК293Т плазмидами pVEAL-BirA и pCMV7-SB100 и затем отбирали трансформанты НЕК293Т-BirA под селективным давлением антибиотика.

Плазмидные векторы, содержащие нуклеотидные последовательности белков В7 и М1 ортопоксвирусов с *His*- и *Avi*-тегами на С-конце, получали на основе вектора pSWS для транзientной экспрессии генов в клетках млекопитающих [1].

Затем проводили трансфекцию клеток НЕК293Т-BirA указанными векторами и инкубировали клетки в присутствии различных концентраций биотина. С помощью ИФА и иммуноблоттинга подтверждено наличие биотинилированных белков в культуральной среде. Показано, что поликлональная кроличья сыворотка и моноклональные антитела к В7 и М1 связываются с данными белками.

Таким образом, разработанная клеточная линия НЕК293Т-BirA может быть использована для получения биотинилированных рекомбинантных белков без необходимости проводить несколько дополнительных операций после выделения белка, включая биотинилирование экзогенными реагентами, очистку и диализ.

### Литература

1. Меркульева Ю. А., Щербаков Д. Н. Разработка панели рекомбинантных иммунодоминантных белков ортопоксвирусов для отбора высокоэффективных нейтрализующих моноклональных антител // VII Междунар. конф. молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. 2020. С. 93–94.

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках ГЗ-41/21 «Разработка терапевтических рекомбинантных широконейтрализующих антител против патогенных для человека ортопоксвирусов».



## МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА И ИММУНИТЕТА СЛЕПОГО КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ ПРОБИОТИКОМ НА ОСНОВЕ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* GM5\*

А. А. Николаева, Г. Ф. Лутфуллина, А. М. Марданова

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

✉ azazel1212@rambler.ru

### Аннотация

Штамм *B. subtilis* GM5 модулирует экспрессию генов белков плотного контакта: увеличивает уровень экспрессии JAM2 в 8,4 раза и уменьшает CLDN1 в 4,8 раза относительно контроля ( $p < 0,05$ ), при этом экспрессия белка цитоплазматической пластинки (ZO1) не имеет достоверных различий относительно контрольной группы. Экспрессия гена муцина (MUC2), гена транспортера глюкозы (GLUT1) тканей слепого кишечника цыплят опытной группы не отличается от экспрессии цыплят контроля. Выявлено влияние пробиотика на экспрессию генов иммунитета: уровень экспрессии интерлейкина-8 (IL-8) был повышен в опытной группе в 6,1 раз, а гена фактора некроза опухоли (TNFSF16) — снижен в 2,9 раз относительно контроля.

Микробиота желудочно-кишечного тракта играет важную роль в формировании иммунной компетентности и функционировании пищеварительной системы цыплят-бройлеров. Пробиотики широко применяются в птицеводстве как агенты для профилактики инфекционных заболеваний, повышения продуктивности животных, стимуляции роста, улучшения потребления питательных веществ. Исследование механизмов действия пробиотиков важно для определения эффективности штаммоспецифичного препарата и оптимальной концентрации, необходимой организму животных.

Цель работы — оценка влияния пробиотика на основе спор *B. subtilis* GM5 на экспрессию генов белков плотного контакта (CLDN1, JAM2, ZO1), генов цитокинов, включая интерлейкин (IL-8) и суперсемейство фактора некроза опухоли (TNFSF16), гена муцина (MUC2) и транспортера глюкозы (GLUT1) в тканях слепого кишечника цыплят-бройлеров.

Эксперимент *in vivo* на цыплятах-бройлерах кросса Ross-308 проведен в условиях фермерского хозяйства «Лачен». Из цыплят суточного возраста (в количестве 60 голов) сформировали контрольную группу, получавшую полнорационный комбикорм, и опытную группу, принимающую комбикорм с добавлением суспензии спор штамма GM5 в концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/г. Образцы ткани слепого кишечника отобраны от 35-суточных цыплят-бройлеров (по три цыпленка из каждой группы). Содержимое слепого кишечника удаляли, образцы ткани промывали в PBS-буфере и хранили в реагенте для стабилизации ДНК/РНК при  $-80^\circ\text{C}$ . Из образцов ткани РНК выделена с использованием реагента TRIzol. Концентрацию такой РНК оценивали с помощью Nanodrop 2000. Для измерения уровня экспрессии генов применялся метод количественной ОТ-ПЦР с использованием коммерческого набора OneTub RT-PCR SYBR и системы ПЦР в реальном времени (Bio-Rad iCycler). Уровни отдельных транскриптов были нормализованы по сравнению с уровнем экспрессии гена бета-актина (ACTB). Относительная экспрессия гена рассчитана с помощью алгоритма  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , а количество гена-мишени — по формуле  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

Уровень экспрессии гена адгезивного белка JAM2 у цыплят опытной группы повышался в 8,4 раза, а гена CLDN1 — снижался в 4,8 раз относительно цыплят контроля ( $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии белка цитоплазматической пластинки (ZO1) у цыплят, получавших кормовую добавку, не показывал достоверных различий относительно контроля. Также экспрессия основного секреторного муцина (MUC2) и гена транспортера глюкозы (GLUT1) была на одном уровне в тканях слепого кишечника цыплят опытной и контрольной групп. Экспрессия генов интерлейкина-8 (IL-8) была повышена в опытной группе в 6,1 раз, а гена фактора некроза опухоли (TNFSF16) — снижена в 2,9 раз относительно контроля. Таким образом, пробиотик на основе *B. subtilis* GM5 модулировал экспрессию генов слепого кишечника, связанных с кишечными иммунными реакциями, барьерной функцией и чувствительностью к питательным веществам.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 20-34-90130).  
© А. А. Николаева, Г. Ф. Лутфуллина, А. М. Марданова, 2022

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ОДНОГО ИЗ ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ \***Г. А. Олейник<sup>1</sup>, А. А. Черносов<sup>1</sup>, В. В. Коваль<sup>1,2</sup>, С. В. Баранова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ zakabluk@niboch.nsc.ru

**Аннотация**

Среди большого разнообразия организмов, существующих на нашей планете, некоторые из них способны функционировать при низкой температуре. Такие организмы содержат лед-связывающие белки (ЛСВБ), различающиеся по своему строению, но обладающие одним и тем же свойством: способностью связываться с поверхностью льда и влиять на его рост. Лед-связывающие белки снижают температуру замерзания раствора, воздействуют на кинетику роста льда в процессе кристаллизации и препятствуют перекристаллизации [1]. Таким образом, эти белки предотвращают повреждение и гибель клеток.

Применение свойств ЛСВБ возможно в различных областях: от простых бытовых нужд (сохранение свойств и качеств замороженных продуктов) до более специализированных (в качестве криопротектора при замораживании биоматериалов и в криохирургии) [2]. Поэтому важно изучать свойства и структуру таких белков.

Чтобы проанализировать структуру лед-связывающих белков, требуется достаточно большое количество белка. Для этого необходимо создать метод для его получения, выделения и очистки. В данной работе выделен и characterized белок-антифриз IV класса (P80961), а также разработан новый способ для его выделения и наработки.

**Литература**

1. Venketesh S., Dayananda C. Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins // Crit. Rev. Biotechnol. 2008. Vol. 28. P. 57–82.
2. Dolev M. B., Braslavsky I., Davis P.L. Ice-Binding proteins and their function // Annu. Rev. Biochem. 2016. Vol. 85. P. 515–542.

\* Исследования выполнены при поддержке проекта базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН (№ 0245-2021-0002) и гранта Минобрнауки России (№ 075-15-2022-263).

© Г. А. Олейник, А. А. Черносов, В. В. Коваль, С. В. Баранова, 2022

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* НА ПОВЕРХНОСТНЫХ СТОЧНЫХ ВОДАХ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ СЫРЬЯ ДЛЯ БИОДИЗЕЛЯ

М. Г. Петрова<sup>1,2</sup>, К. В. Горин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

<sup>2</sup>Московский политехнический университет

✉ maria.maripetrova@yandex.ru

### Аннотация

В работе оценено культивирование липидопroduцирующего штамма микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV1 на поверхностных сточных водах. В качестве питательных сред использованы поверхностные стоки, среда ВММ, а также их смеси в различных соотношениях. Культивирование проводилось в условиях, максимально приближенных к естественным, и в лабораторных условиях, с поддержанием постоянной температуры и освещенности.

Основное содержание исследования составляет: оценка способности культуры *Chlorella Vulgaris* к росту на поверхностных сточных водах и к продуцированию жирных кислот, которые в дальнейшем могут применяться в качестве сырья для биодизеля.

Возможность культивирования микроводоросли на поверхностных стоках исключает потребность использования большого объема пресной воды для приготовления питательной среды. Таким образом, культивируя микроводоросли на сточных водах, можно решить сразу несколько задач: очистка воды и получение полезных компонентов для биодизеля [1].

Входящие в состав биомассы жирные кислоты идентифицированы и количественно определены методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием.

Высокий уровень антропогенного загрязнения городской среды, в том числе поверхностных сточных вод, требует организации безопасного производства и снижения негативного воздействия на окружающую среду [2]. Биомасса микроводорослей представляет собой наиболее перспективное возобновляемое непищевое сырье для биодизеля. В связи с этим актуально исследование биосинтеза липидов. Биомасса микроводорослей *Chlorella vulgaris* позволяет не только очистить поверхностные сточные воды, но и получить коммерчески ценные продукты безотходным способом [3].

Культивирование микроводоросли проводилось в условиях, максимально приближенных к естественным (рис. 1), и в лабораторных условиях (рис. 2). Содержание липидов определялось методом газовой хроматографии с использованием пламенно-ионизационного детектора и кварцевой капиллярной колонки. Рост биомассы контролировали с помощью измерения оптической плотности суспензии микроводоросли при длинах волн 680 и 750 нм с помощью мультимодального ридера (*Thermo Scientific Varioscan LUX*), измерения проводились 1 раз в сутки в 3 повторностях.

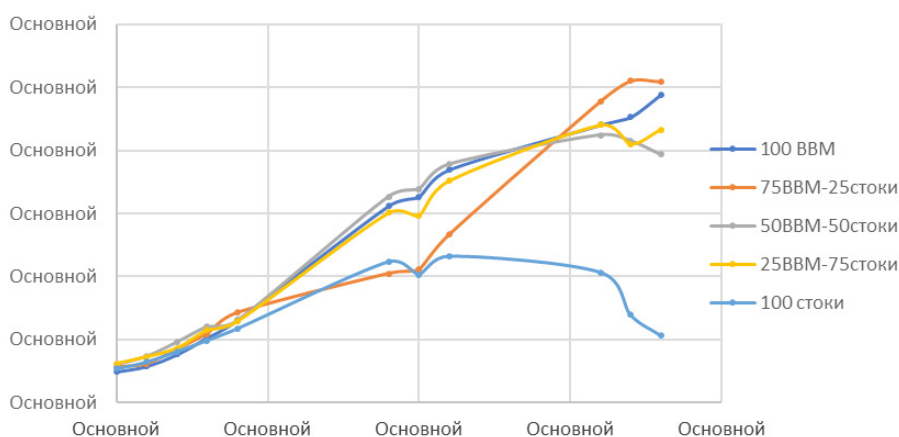


Рис. 1. Кривые роста культуры *Chlorella vulgaris*, выращенной на питательных средах разного состава, в условиях, максимально приближенных к естественным, при длине волны 750 нм

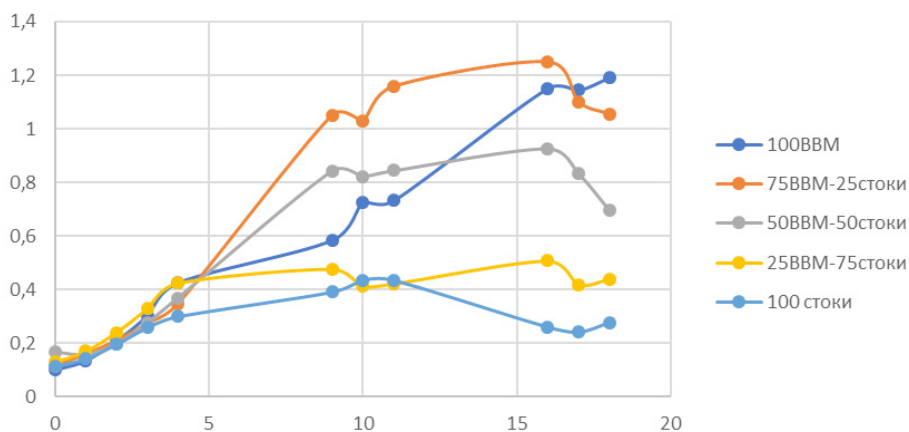


Рис. 2. Кривые роста культуры *Chlorella vulgaris*, выращенной на питательных средах разного состава, в лабораторных условиях, при длине волны 750 нм

В эксперименте использовали питательные среды различного состава: 100 % BBM; 75 % BBM : 25 % сточные воды; 50 % BBM : 50 % сточные воды; 25 % BBM : 75 % сточные воды; 100 % сточные воды.

#### Литература

1. Harun R., Singh M., Forde G. M., Danquah M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products // *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2010. Vol. 14. P. 1037–1047.
2. Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review // *Bioresource Technol.* 2011. Vol. 102. P. 71–81.
3. Abinandan S., Shanthakumar S. Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review // *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2015. Vol. 52. P. 123–132.

**РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА *L. LACTIS***

П. Ю. Печенов, Д. А. Гарагуля, А. В. Летаров

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

✉ pechenov.p@gmail.com

**Аннотация**

Разработан новый инструмент для редактирования генома лактококков, основанный на нуклеаза-дефективной системе CRISPR/Cas, ассоциированной с транспозоном. Данная двухплазмидная система позволяет вносить инсерции больших участков ДНК. С целью оптимизации экспрессии системы подобраны наиболее эффективный для данной задачи промотор и заменены сайты связывания рибосомы для каждого из белков системы.

*L. lactis* — это один из наиболее важных и широко применяемых микроорганизмов в промышленности (производство продуктов питания, получение вторичных метаболитов и некоторых ферментов). Небольшой размер геном (2,3 Мбаз) и успешное развитие методов геной инженерии для данного вида сделало его основным модельным организмом в исследованиях молочнокислых бактерий. Таким образом, развитие современных способов редактирования генома обеспечит новые возможности в исследовании и перенаправлении биосинтетических путей в желаемую сторону, в улучшении понимания функционирования генов и усилении пробиотических свойств [1]. Для решения данной проблемы адаптирована ранее описанная система редактирования генома из *Vibrio cholerae* для грамотрицательных микроорганизмов, в которой Tn7-подобный транспозон ассоциирован с нуклеаза-дефективной системой CRISPR/Cas, катализирующей РНК-направляемую интеграцию мобильного генетического элемента в геном [2]. С целью эффективной трансляции каждого из генов данной системы заменены их сайты связывания рибосомы на транскрибируемые в *L. lactis*. Проведена серия экспериментов с целью подбора наиболее подходящего промотора для экспрессии генов системы и направляющей РНК. Определены наиболее подходящие условия для редактирования. В результате разработан простой и удобный инструмент редактирования генома *L. lactis*, обеспечивающий высокоэффективную интеграцию в геном, в том числе и больших вставок (более 10 000 п. о.).

**Литература**

1. Börner R. A., Kandasamy V., Axelsen A. et al. Genome editing of lactic acid bacteria: opportunities for food, feed, pharma and biotech // FEMS Microbiol. Lett. 2019. Vol. 366 (1). P. 291.
2. Klompe S.E. et al. Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration // Nature. 2019. Vol. 571. P. 219–225.

## EVALUATION OF THE THERMAL STABILITY OF PROTEIN-CONTAINING HYDROGELS BASED ON SODIUM ALGINATE BY CYCLIC VOLTAMMETRY

E.A. Pogorelkina

*Udmurt State University, Izhevsk*

✉ pogorelka0@gmail.com

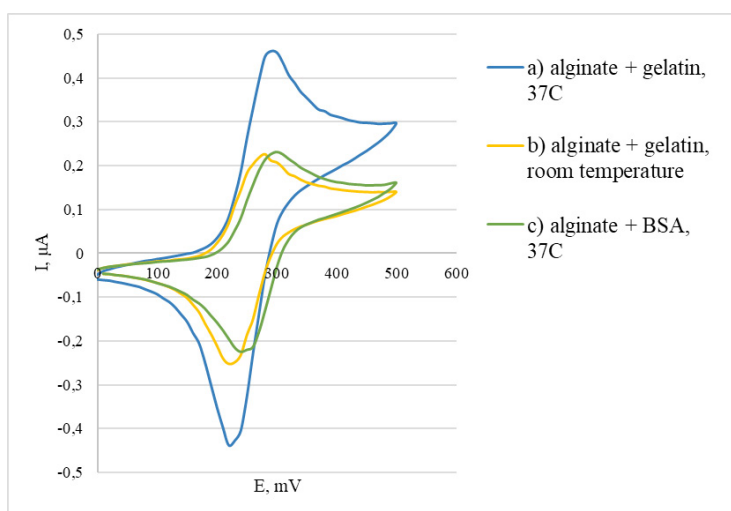
### Abstract

The effect of temperature on the electrochemical characteristics of toluidine blue (TB) in the medium of protein-containing (gelatin and bovine serum albumin (BSA)) hydrogels based on sodium alginate was evaluated. It was found that incubation of the gelatin-alginate hydrogel at 37 °C increases its permeability to TB, while the BSA-based hydrogel is more thermally stable.

Protein-containing hydrogels are a promising material for creating protease activity sensors, for example, for modifying electrode systems in electrochemical analysis [1]. In this paper, we propose a hydrogel based on sodium alginate, a polysaccharide that acts as a matrix for a protein substrate of a target protease. Some proteases are more active at 37 °C than at room temperature, and the incubation of a modified sensor with the analyte at 37 °C allows to speed up the analysis. Therefore, it is important that the hydrogel is exposed only to proteolysis during the assay. To eliminate the effect of incubation temperature on the analysis results, it is necessary to evaluate the thermal stability of hydrogels based on sodium alginate containing gelatin and bovine serum albumin, which are used as model substrates.

The work is based on the method of cyclic voltammetry, which is carried out using planar three-electrode systems. Toluidine blue (TB) is used as an electrochemical label, which diffuses to the electrode surface through the hydrogel, and the electrochemical activity of TB is measured on the electrode surface. The height of the oxidative and reductive peaks of TB in the obtained voltammograms depends on the permeability of the hydrogel, which makes it possible to estimate the density of the hydrogel at different temperatures.

The working electrode of the planar three-electrode system was covered with a hydrogel containing 2 % (mass) of sodium alginate and 1.5 % gelatin and incubated at room temperature and at 37 °C for 20 minutes. Then,  $10^{-4}$  M TB was applied over the hydrogel and the data from a potentiostat-microammeter were taken in the potential range of 0...500 mV at a sweep rate of 65 mV/s; 4 cycles were taken every 3 minutes. Measurements under the same conditions were carried out in a hydrogel medium containing 2 % alginate and 1 % BSA. According to the averaged data of 4 cycles obtained at the 20<sup>th</sup> minute of measurements, cyclic voltammograms characterizing the electrochemical behavior of TB in the medium of the observed hydrogels were constructed (See Figure). Using the eL-Chem viewer software [2], the heights of oxidation peaks (negative current values on the obtained graphs) and reduction peaks (positive current values) were estimated.



Current-voltage curves of TB in the medium of the hydrogel: *a* — alginate 2 % + gelatin 1,5 %, incubation at 37 °C; *b* — alginate 2 % + gelatin 1,5 %, incubation at room temperature; *c* — alginate 2 % + BSA 1 %, incubation at 37 °C. Tris-HCl, pH = 8,0. Potential range of 0...500 mV, a sweep rate is 65 mV/s. Average data of 4 cycles on the 20<sup>th</sup> minute of the measurement

In the medium of a gelatin-containing hydrogel incubated at 37 °C, the peaks of oxidation ( $I_{p,ox}$ ) and reduction ( $I_{p,red}$ ) are higher than the peaks obtained in the experiment with the incubation of the same hydrogel at room temperature. At a temperature of 37 °C, the reduction peak value  $I_{p,red}$  is 0.419  $\mu$ A, and  $I_{p,ox} = -0.472$   $\mu$ A. At room temperature, these parameters were  $I_{p,red} = 0.218$   $\mu$ A and  $I_{p,ox} = -0.256$   $\mu$ A. This may indicate that the melting point of gelatin was reached at a temperature of 37 °C, as a result of which the hydrogel became more permeable to TB, which resulted in higher peaks of oxidation and reduction of the electrochemical label. In the hydrogel medium containing BSA and incubated at 37 °C,  $I_{p,red}$  and  $I_{p,ox}$  are 0.227  $\mu$ A and  $-0.224$   $\mu$ A, respectively, and are close to the values obtained in the gelatin-containing hydrogel medium incubated at room temperature.

Thus, a hydrogel consisting of sodium alginate and BSA is more thermally stable than a gelatin-containing hydrogel, at least at a temperature of 37 °C, which makes it preferable to modifying electrode systems in the electrochemical determination of protease activity.

### References

1. Ionescu R. E., Cosnier S., Marks R. S. Protease amperometric sensor // Analytical Chem. 2006. Vol. 78, № 18. P. 6327–6331.
2. Hrbac J., Halouzka V., Trnkova L., Vacek J. L-Chem Viewer: A Freeware Package for the Analysis of Electroanalytical Data and Their Post-Acquisition Processing // Sensors. 2014. Vol. 14. P. 13943–13954.

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НОВОГО ПОДХОДА К ЛЕЧЕНИЮ СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРОЛЕМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Д. Д. Подгало<sup>1</sup>, Д. К. Малинина<sup>2</sup>, В. В. Костенко<sup>2</sup>, Ю. В. Парщикова<sup>2</sup>,  
В. А. Косс<sup>3</sup>, П. Д. Олейников<sup>2</sup>, В. В. Гуща<sup>2</sup>, Ю. С. Бусыгина<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Смоленский государственный медицинский университет

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

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

<sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

✉ podgalo32@icloud.com

### Аннотация

В работе проводится анализ научной литературы и предлагается новый способ лечения семейной гиперхолестеролемии с использованием методов генной инженерии. Обоснованы выбранные элементы для разработки такого препарата.

### Введение

Семейная гиперхолестеролемиа (СГ) — одно из самых распространенных генетических заболеваний в мире. Это моногенное аутосомно-доминантное заболевание, сопровождающееся значительным повышением уровня холестерина в крови и, как следствие, преждевременным развитием атеросклероза и ИБС в молодом возрасте [1].

В 80–90 % случаев СГ связана с наличием мутации в гене рецептора ЛПНП [1]. Проведенный нами анализ с использованием базы данных ClinVar показал, что на этот ген приходится 1812 мутаций, приводящих к развитию СГ, при этом 61 % (1106 мутаций) локализован в рамках 4-го экзона.

СГ требует регулярного врачебного контроля и пожизненного лечения, которое может оказаться неэффективным, что делает необходимым разработку новых терапевтических подходов. Поскольку СГ в основном связана с мутациями в гене рецептора ЛПНП, это заболевание является оптимальным кандидатом для генной терапии.

В настоящий момент только один генно-инженерный препарат для лечения СГ проходит клинические исследования [1], а на рынке лекарств из этой группы отсутствуют, что делает актуальным вопрос о разработке препарата для генной терапии СГ.

**Цель работы** — проанализировать литературу по методам генной терапии и применяющимся компонентам, чтобы предложить наилучший вариант лечения СГ.

### Материалы и методы

При проведении обзора литературных источников полученные данные сравнивались с используемыми подходами при производстве генотерапевтических препаратов и для создания протокола разработки лекарства для лечения СГ.

### Результаты

В качестве вектора предлагается применять аденоассоциированный вирус 8 (AAV8), который обладает рядом преимуществ по сравнению с другими вирусными векторами [1]. Однако производство AAV8 требует использования хелперной плазмиды с генами вируса-помощника или самих вирусов-помощников: аденовируса или герпесвируса [2].

В настоящее время применение CRISPR/Cas9 или других систем редактирования имеет ряд ограничений: нецелевое редактирование, неконтролируемый клеточный ответ на повреждение ДНК, иммуногенность, стимуляция хромосомных aberrаций [1].

В связи с этим для лечения СГ предлагается задействовать терапевтический ген как эписому. Длина кодирующей части гена рецептора ЛПНП составляет 2580 п. н., что делает доступным использование трансгена для доставки через AAV8, емкость которого ограничена примерно 5000 п. н. Кассета, находящаяся внутри капсида AAV8, будет состоять из трансгена и необходимых для экспрессии элементов: промотора, интрона, 3'-нетранслируемой области (НТО), сигнала полиаденилирования, а также инвертированных концевых повторов, необходимых для перемещения кассеты в капсид при производстве AAV8.



---

Помимо тропности самого AAV8, специфичность будет обеспечиваться за счет промотора, который активизируется только в гепатоцитах, а также путем добавления сайтов связывания с микроРНК в 3'-НТО, таким образом подавляя экспрессию в нежелательных органах через РНК-интерференцию.

#### **Выводы**

Лечение СГ требует разработки новых подходов терапии, одним из которых может стать геннотерапевтический препарат. Непреодолимых ограничений для их разработки обнаружено не было. Нами составлен протокол разработки препарата для генной терапии СГ.

#### **Литература**

1. Rodriguez-Calvo R., Masana L. Review of the scientific evolution of gene therapy for the treatment of homozygous familial hypercholesterolaemia: past, present and future perspectives // J. Med. Genet. 2019. Т. 56, № 11. С. 711–717.
2. Penaud-Budloo M. et al. Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production // Mol. Therapy-Methods & Clinical Development. 2018. Т. 8. С. 166–180.

**НЕОРГАНИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ В КАЧЕСТВЕ ЯДРА ДЛЯ ТЕРАНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ\***

В. К. Попова, А. А. Ломзов, Е. В. Дмитриенко

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

✉ elenad@niboch.nsc.ru

**Аннотация**

Наночастицы, благодаря размерам, близким к биологическим объектам, и увеличенной удельной поверхности, широко применимы в биомедицинских исследованиях. В работе предложены протоколы масштабируемого синтеза монодисперсных сферических наночастиц диоксида кремния, карбоната и фосфата кальция размером менее 200 нм. Показано, что полученные наноматериалы перспективны в качестве компонентов терапевтических и диагностических систем.

Стабильность наноматериалов на основе нерастворимых солей кальция (СаНЧ) зависит от pH окружающей среды, что особенно перспективно при использовании СаНЧ в качестве транспортеров биологически активных соединений (БАС) в онкотрансформированные ткани [1]. Наночастицы диоксида кремния (SiНЧ) интересны благодаря высокой химической стабильности и возможности функционализации поверхности [2]. Однако, как и любые материалы для применения *in vivo*, наночастицы (НЧ) должны быть нетоксичны, стабильны в физиологических условиях, обладать высокой емкостью по отношению к БАС, а также монодисперсным распределением размеров до 200 нм (для обеспечения возможности внутривенного введения конструкций). Воспроизводимый синтез таких материалов является нетривиальной задачей [3]. Данное исследование направлено на разработку наноносителей, обладающих высокой емкостью по отношению к лекарственным молекулам и БАС, способным к специфическим взаимодействиям, для конструирования на их основе тераностических систем.

В работе получены СаНЧ и SiНЧ, отвечающие всем заявленным критериям. Показана перспективность их применения в качестве компонентов терапевтических и диагностических систем. Для создания многослойных конструкций транспорта и диагностики разработаны универсальные протоколы ковалентной функционализации поверхности НЧ, обеспечивающие присоединение любых молекул, содержащих концевую аминогруппу, в том числе красителей, полимеров и белков. Кроме того, подготовлены протоколы нековалентного присоединения флуоресцентных красителей (Cy5/Cy7), обеспечивающих детекцию наноконструкций *in vitro* и *in vivo*, а также белков (альбумин) и лекарственных препаратов (доксорубицин).

Доксорубицин (DOX) выбран в качестве модельного лекарственного агента. Показана высокая эффективность взаимодействия DOX с НЧ как с исходными, так и с модифицированными полимерами НЧ. Установлен pH-зависимый профиль высвобождения DOX из конструкций НЧ-DOX. На клеточных линиях НЕК 293 и А549 продемонстрировано отсутствие токсичности НЧ, а для НЧ-DOX цитотоксичность сопоставима и выше в сравнении с индивидуальным лекарством.

Для СаНЧ и SiНЧ получены конструкции специфичного выделения молекул с использованием стрептавидин-биотинового взаимодействия. Показана емкость для разработанных наноматериалов по отношению к биомолекулам, которая значительно больше, чем для исследованных коммерческих препаратов.

В работе получены наноносители, обладающие высокой емкостью по отношению к целевым низко- и высокомолекулярным органическим соединениям, применимые в биомедицинских целях.

**Литература**

1. Maleki Dizaj S. et al. An update on calcium carbonate nanoparticles as cancer drug/gene delivery system // Expert Opin. Drug Delivery. 2019. Vol. 6 (4). P. 331–345.
2. Chen L. et al. Recent developments of mesoporous silica nanoparticles in biomedicine // Emergent Mater. 2020. Vol. 3 (3). P. 381–405.
3. Umaphathi A. et al. Engineered nanomaterials for biomedical applications and their toxicity: a review // Environ. Chem. Lett. 2021. P. 1–24.

\* Работа выполнена при поддержке базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН (№ 121031300042-1), РФФИ (№ 20-04-00719) и Российского научного фонда (№ 21-74-00120).

© В. К. Попова, А. А. Ломзов, Е. В. Дмитриенко, 2022

## СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ УТИЛИЗАЦИИ ПЕСТИЦИДОВ

Е. О. Приставка, А. А. Левчук

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

✉ katya-i-95@mail.ru

**Аннотация**

Проведен скрининг микроорганизмов, способных к деструкции пестицида на основе имазамокса. Установлено, что бактерии могут расти на среде с концентрацией имазамокса 1,44 г/л (превышение ПДК пестицида для почвы в 9 раз), утилизируя до 60 % действующего вещества в течение 7 дней. Выделены 4 штамма грибов и 6 штаммов бактерий, обладающих высокой деструктивной активностью по отношению к имазамоксу.

Производство, ассортимент и использование химических средств защиты растений с каждым годом увеличивается, поэтому проблема загрязнения почв гербицидами приобретает все большую актуальность. Исследования, касающиеся поведения пестицидов в почве, крайне малочисленны, а данные по скорости их разложения относятся к рекламной информации или инструкциям по применению. Большого внимания в решении данного вопроса заслуживают биотехнологические подходы, основанные на использовании микроорганизмов-деструкторов, способных метаболизировать пестициды в безопасные формы, что позволяет избежать образования продуктов вторичного загрязнения. Такой подход является наиболее экологичным и требует наименьших затрат. В связи с этим поиски штаммов микроорганизмов-деструкторов и изучение микробиологического способа очистки почвы от пестицидов — актуальное направление исследований.

На первом этапе в данной работе мы определили максимальную концентрацию пестицида, при которой микроорганизмы характеризуются активным ростом на минеральной питательной среде, содержащей пестицид в качестве единственного источника углерода. Установлено, что бактерии способны к росту на среде с концентрацией имазамокса 1,44 г/л, что превышает ПДК пестицида для почвы в 9 раз.

Для изучения деградационного потенциала микроорганизмов, взятых из коллекции музея ИрИХ СО РАН, мы провели предварительный скрининг по их выживаемости. Для этого в минеральную среду Кирка для грибов и в среду 8Е для бактерий добавляли пестицид имазамокс в концентрации 1,44 г/л. Выживаемость определяли следующим образом: для грибов — визуально по накоплению мицелия и началу спорообразования, для бактерий — высевом на твердую питательную среду. Всего в эксперимент введено 20 штаммов грибов и 9 штаммов бактерий. Результаты опытов оценивали через неделю: по системе «++» — наличие активного роста, «+» — наличие роста, «-» — отсутствие роста.

Для дальнейшей работы отобрали 19 наиболее перспективных микроорганизмов. Спустя неделю после их инкубации с пестицидом сделан отбор проб для установления остаточных количеств пестицида. Пробы центрифугировались для отделения биомассы и анализировались методом ВЭЖХ. Массовую долю имазамокса определяли с помощью хроматографической системы Agilent 1260 с УФ-детектором и обращенно-фазовой колонкой. В качестве элюента использовалась смесь ацетонитрил — 0,1 % ортофосфорная кислота в соотношении 22 : 78, по объему. Аналитическая длина волны 240 нм, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, время записи хроматограммы 6,3 мин. Контролем служила стерильная питательная среда. Результаты представлены в таблице. По полученным данным видно, что спустя неделю культивирования микроорганизмов в питательной среде с имазамоксом убыль пестицида составила более 50 %.

**Остаточное содержание имазамокса под действием микроорганизмов**

Микроорганизм	Имазамокс, 1,44 г/л
Бактерии	1 нед, % от контроля
102	42
109	43
112	42
114	44
108	43

Микроорганизм	Имазамокс, 1,44 г/л
Грибы	1 нед, % от контроля
2	53
10	51
35	54
52	50
60	45

Следующий этап исследования — изучение динамики разложения пестицида. Для этого микроорганизмы культивировались в присутствии имазамокса в течение 10 дней с ежедневным отбором проб. При снижении концентрации пестицида в два раза визуально наблюдается прирост биомассы на питательной среде с пестицидом, но деструкция исследуемого вещества происходит не так интенсивно. Убыль вещества не превышала 18 %.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в нашей коллекции есть перспективные микроорганизмы для биodeградации пестицида, которые способны в краткие сроки утилизировать до 60 % действующего вещества. К ним относятся 4 штамма грибов (*Phanerochaete sp.*, шт. 10; *Fomitopsis sp.*, шт. 35; *Paecilomyces sp.*, шт. 52; *Trichaptum sp.*, шт. 60) и 6 штаммов бактерий (*Pseudomonas sp.*, шт. 102; *Pseudomonas sp.*, шт. 90; *Pseudomonas sp.*, шт. 109; *Acinetobacter sp.*, шт. 112; *Acinetobacter sp.*, шт. 114; *Rhodococcus sp.*, шт. 108).

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НУКЛЕОКАПСИДА SARS-CoV-2 РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ COVID-19\*

А. Я. Рак<sup>1</sup>, С. А. Дони́на<sup>1</sup>, Я. А. Забрóдская<sup>1,2</sup>, И. Н. Иса́кова-Сивак<sup>1</sup>, Л. Г. Руденко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург

✉ alexandrak.bio@gmail.com

### Аннотация

Постоянное появление новых штаммов SARS-CoV-2 и необходимость тестирования иммуногенности новых вариантов вакцин против COVID-19 требует разработки диагностических тест-систем на базе консервативных вирусных антигенов, одним из которых является белок нуклеокапсида. Релевантность существующих диагностических наборов на его основе для определения титра противовирусных антител, выработанных в ответ на инфекцию недавно появившимися штаммами, неизвестна.

**Цель работы** — получение рекомбинантных белков нуклеокапсида SARS-CoV-2 различных генетических линий и исследование возможности создания на их основе универсальной диагностической тест-системы.

В ходе проведенных исследований получены рекомбинантные белки нуклеокапсида вирусов SARS-CoV-2 пяти генетических линий, проанализированы свойства иммуноферментной тест-системы на их основе в сравнении с коммерчески доступным набором для выявления N-специфичных антител и установлено наличие перекрестной реактивности анти-N антител к различным антигенам.

Число случаев COVID-19, вызываемого новыми штаммами SARS-CoV-2, продолжает расти. Большинство современных иммуноферментных тест-систем, используемых для детекции антител против SARS-CoV-2, разработано на основе поверхностного шипового белка коронавируса; с их помощью невозможно определить, что стало причиной появления противовирусных антител: вакцинация или инфекция. Разработка аналитических тест-систем на основе других белков SARS-CoV-2, в частности консервативного и высокоиммуногенного белка нуклеокапсида (N), в больших количествах синтезируемого в зараженных клетках, для дополнительного скрининга донорского материала при определении иммуногенности новых вакцин против SARS-CoV-2 позволит избежать завышения данных из-за ошибочного включения в группу лиц, перенесших COVID-19 в период вакцинации. Однако важно оценить релевантность иммуноферментных тест-систем, разработанных на основе N-белка референсного штамма SARS-CoV-2, в случае скрининга материала лиц, переболевших вирусами других генетических линий.

В исследовании приняли участие 37 реконвалесцентов COVID-19 и 36 нативных доноров возрастом 21–77 лет. Образцы венозной крови отобраны после получения информированного согласия от доноров спустя ≥ 22 дня после заболевания. Сыворотки отделяли центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин и хранили при –20 °C. Для получения рекомбинантных N-белков использовали препараты РНК, выделенные из вирусов SARS-CoV-2 различных генетических линий:

- hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 (линия B.1, Wuhan);
- hCoV-19/Russia/SPE-R11-27029S/2021 (линия B.1.351, Beta);
- hCoV-19/Japan/TY7-503/2021 (линия P.1, Gamma);
- hCoV-19/Russia/SPE-R11-32759S/2021 (линия B.1.617.2, Delta);
- hCoV-19/Russia/SPE-R11-6243V1/2021 (линия B.1.1.529, Omicron).

Гены, кодирующие N-белки вирусов, амплифицировали с использованием набора BioMaster RT-PCR Kit и клонировали в экспрессионный вектор pETDuet-1 по рестрикционным сайтам BamHI и NotI, добавляя к N-концевой части экспрессируемых белков полигистидиновый таг. Трансформированные плазмидами клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,1 мМ ИПТГ. Полученную биомассу ресуспендировали в буфере, содержащем 100 мкг/мл лизоцима, и лизировали ультразвуком. Очистку белков из осветленного лизата проводили методом металл-аффинной хроматографии на сорбенте His-Bind NTA Agarose. Выделенные фракции и лизаты анализировали методами электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. После влажного переноса на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм белки детектировали антиполигистидиновой пробой (1 : 10000, Thermo Scientific, США). Для исследования сывороток в двукратных разведениях иммуноферментным методом очищенные белки (1,5 мкг/мл) использовали в качестве

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 21-75-30003).

подложки на 96-луночных планшетах высокой сорбции (Thermo, США). Антиген-специфические антитела детектировали с помощью антител козы против IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (1 : 3000, Bio-Rad, США). За конечный титр принимали последнее разведение сыворотки, где оптическая плотность вдвое превышала средний уровень контрольных лунок. Параллельно анализ сывороток проводили с применением коммерчески доступного набора N-CoV-2-IgG PS производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера, Санкт-Петербург.

Эффективная индукция синтеза N-белков штаммов всех генетических линий достигнута при использовании 0,1 мМ ИПТГ через 1 ч культивирования при +37 °С. Выход рекомбинантных белков составил около 1,2 мг на 100 мл бактериальных культур.

Электрофоретическая подвижность полученных белков соответствовала их расчетным молекулярным массам, что хорошо согласовалось с данными иммуоблоттинга. Методом масс-спектрометрического анализа удалось показать чистоту образцов и достоверно различить 5 антигенов.

Вирус-специфические антитела против N-белков различных генетических линий SARS-CoV-2 обнаружены во всех экспериментальных группах. Однако титры противовирусных антител у реконвалесцентов были в несколько раз выше по сравнению с донорами из контрольной экспериментальной группы ( $p < 0,001$ ). Установлено наличие достоверной корреляции ( $R = 0,8582$ ,  $p < 0,0001$ ) между уровнями противовирусных антител, определенными с использованием тест-системы на основе N-белка линии В.1, и коммерчески доступного набора. Чувствительность и специфичность такой тест-системы составили 86,5 и 88,9 % соответственно. Значения, полученные при анализе сывороток лиц, переболевших штаммами hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 и hCoV-19/Russia/SPE-RII-32759S/2021, с помощью тест-систем на основе соответствующих рекомбинантных N-белков, также достоверно коррелировали ( $R = 0,8992$ ,  $R = 0,8303$  соответственно). Обнаружена достоверная корреляция уровней антител для всех реконвалесцентов при параллельном анализе сывороток с использованием тест-систем на основе белков линий В.1 и В.1.351 ( $R = 0,9739$ ,  $p < 0,0001$ ), В.1 и Р.1 ( $R = 0,9569$ ,  $p < 0,0001$ ) и В.1 и В.1.1.529 ( $R = 0,9344$ ,  $p < 0,0001$ ).

Таким образом, в работе получены рекомбинантные N-белки пяти генетических линий SARS-CoV-2, обнаружена кросс-реактивность противовирусных антител по отношению к этим антигенам и показана возможность создания универсальной иммуноферментной тест-системы для скрининга материала переболевших COVID-19, вне зависимости от того, вирус какой генетической линии вызвал заболевание.

**ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕЛАНИНОВ ДЛЯ ИХ СТАНДАРТИЗАЦИИ\***

А. Е. Рассабина, В. Р. Хабибрахманова, Ф. В. Минибаева

Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

✉ AERassabina@yandex.ru

**Аннотация**

Разработана методика выделения, изучены физико-химические свойства и показана антиоксидантная активность меланинов из лишайников *L. pulmonaria* и *L. furfuraceum*. Установлено, что при экстракции меланинов сопутствующими соединениями являются полисахариды. Меланины лишайников обладают парамагнитными, антиоксидантными, хелатирующими свойствами, что делает их пригодными для биотехнологического использования.

Меланины — важные вторичные метаболиты лишайников, обеспечивающие их защиту от различных неблагоприятных факторов среды, например УФ-воздействия [1]. Лишайники относятся к экстремофилам, для них характерен симбиоз гриба (микобионт) и водоросли и/или цианобактерии (фотобионт). Такое тесное взаимоотношение определяет уникальность синтезируемых вторичных метаболитов, в том числе меланина. Меланины лишайников изучены крайне ограничено.

Меланины — это высокомолекулярные темные пигменты, которые в зависимости от вида мономерного звена подразделяются на различные типы: эумеланин, алломеланин и др. Для меланинов характерно широкое функциональное применение: от создания на их основе высокоэффективных лекарственных препаратов до получения перспективных наноматериалов для электроники и оптики. Меланины могут быть выделены из различных природных источников, однако более перспективным является использование биотехнологии для их получения. При этом важный аспект приобретает стандартизация таких меланинов.

На сегодняшний день существуют стандартизированные меланины, выделенные из *Sepia officinalis*, и меланины синтетического происхождения. Эти меланины являются эумеланинами, поэтому их использование в качестве эталонов при исследовании других типов меланинов некорректно. В связи с этим актуальна разработка методики выделения меланинов, включающая подбор условий их экстрагирования, очистки и определения физико-химических характеристик. Методика получения меланина может сильно отличаться в зависимости от применяемого природного источника.

В настоящей работе проведены исследования по разработке методики выделения меланинов из лишайников *L. pulmonaria* и *L. furfuraceum*. В опытах *in vivo* установлено, что при УФ-меланизации в талломах этих лишайников изменялся качественный и количественный состав фенольных соединений и происходило накопление меланина. Использование стандартной методики выделения меланинов, включающей щелочное экстрагирование, кислотное осаждение и обработку органическими растворителями, показало, что может быть получено около  $3,0 \pm 0,5$  % меланинов. Физико-химический анализ позволил установить, что в их составе присутствуют полисахариды, которые с помощью колоночной хроматографии могут быть отделены от целевого компонента-меланина. Применение различных методов и химических реагентов дало возможность определить, что в отношении ДФПГ ингибирующая концентрация ( $IC_{50}$ ) меланинов составляет 273–296 мкг/мл. Оценена хелатирующая активность меланинов лишайников в отношении ионов  $Fe^{2+}$ . Антиоксидантная активность, установленная методом ФММ для выделенных меланинов, составляла 40,65–42,50 мгААЕ/г меланина.

Полученные результаты позволяют обосновать перспективу выделения меланинов из лишайников для их практического использования.

**Литература**

1. Gauslaa Y., Solhaug K.A. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria* // *Oecologia*. 2001. Vol. 126. P. 462–471.

\* Исследования выполнены при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» (договор 16197ГУ/2020 от 24.12.2020).

## РАЗРАБОТКА ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА АРХАРА

А. Е. Рахманина<sup>1</sup>, С. В. Беленькая<sup>2</sup>, А. А. Бондарь<sup>3</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,4</sup><sup>1</sup>Новосибирский государственный университет<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск<sup>4</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул

✉ a.rakhmanina@g.nsu.ru

**Аннотация**

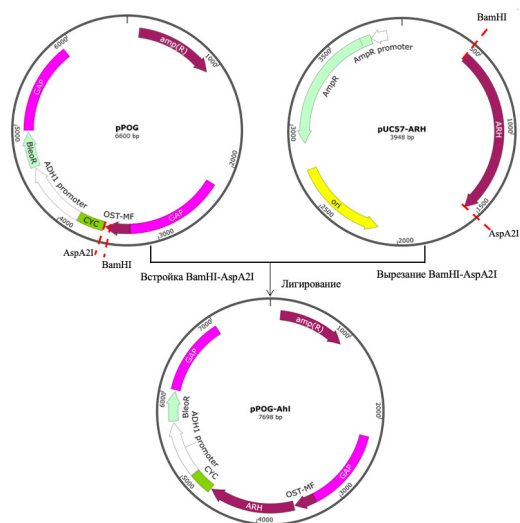
Впервые установлена нуклеотидная последовательность и экзон-интронная организация гена химозина архара (*Ovis ammon*). Выведена последовательность мРНК химозина архара и сконструирован плазмидный вектор, обеспечивающий синтез и секрецию рекомбинантного прохимозина архара в дрожжевой системе экспрессии. Получен эукариотический продуцент рекомбинантного химозина архара.

Химозин — один из ключевых молокосвертывающих ферментов, используемых в процессе производства сыра или творога. Химозины млекопитающих гидролизуют пептидную связь Phe105-Met106 в молекуле каппа-казеина, приводя к образованию сычужного сгустка [1].

Применение различных биотехнологических методов позволяет расширить список актуальных в промышленности белков и ферментов. Так, рекомбинантный химозин одногорбого верблюда эффективно гидролизует каппа-казеин коровьего молока [2]. Поиск и изучение подобных протеинкиназ, превосходящих доступные нам по эффективности, открывает перспективы развития производственной деятельности человека.

Цель данной работы — получение рекомбинантного химозина архара.

Ранее была проделана работа по выделению геномной ДНК из лимфоцитов крови архара и амплификации двух перекрывающихся частей гена химозина архара с матрицы геномной ДНК. ДНК таких фрагментов гена наработана, очищена от компонентов ПЦР и подвергнута прямому секвенированию по методу Сэнгера на автоматических генных анализаторах ABI3130XL. В результате сборки полученных секвенограмм установлена структура



Общая схема клонирования последовательности прохимозина (проХн) архара, оптимизированной под систему продукции *K. lactis*, в экспрессионный вектор pPOG

гена химозина архара размером 10169 н. п. С помощью сравнительного анализа и выравнивания локализованы границы экзонов/интронов исследуемого гена и выведена структура соответствующей мРНК, кодирующей препрохимозин архара.

После «удаления» участка, кодирующего префрагмент и интронов из полученной нуклеотидной последовательности, ее кодонный состав был оптимизирован под дрожжевую систему экспрессии. Спроектированная конструкция синтезирована на заказ (ООО «ДНК-синтез», Россия) и произведена в составе клонирующего вектора pUC57\_Arh.

В ходе данной работы последовательность гена химозина архара клонирована в составе ранее полученного экспрессионного вектора pPOG (см. рисунок).

После этого полученным экспрессионным вектором pPOG-Arh проводили трансформацию компетентных клеток *Kluyveromyces lactis*. С целью выделения наиболее эффективного штамма-продуцента рекомбинантного химозина архара отбирали индивидуальных клонов путем культивирования и измерения молокосвертывающей активности культуральной жидкости.

**Литература**

1. Carles C., Martin P. Kinetic study of the action of bovine chymosin and pepsin A on bovine kappa-casein // Arch. Biochem. Biophys. 1985. Vol. 242 (2). P. 411–416.
2. Kappeler S. R., van den Brink H. J., Rahbek-Nielsen H. et al. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. P. 342. P. 647–654.



## ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ КОККОВЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АТМОСФЕРЫ НОВОСИБИРСКА В ЗИМНИЙ ПЕРИОД\*

М. Е. Ребус<sup>1</sup>, Н. А. Соловьянова<sup>1</sup>, И. С. Андреева<sup>1</sup>, М. Р. Кабилов<sup>2</sup>, А. С. Сафатов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ rebusmaxim@yandex.ru

### Аннотация

В период с декабря 2021 г. по февраль 2022 г. проведен микробиологический анализ образцов атмосферных аэрозолей Новосибирска. Выделенные культивируемые микроорганизмы представлены бактериями и грибами с концентрацией в разных образцах от нескольких единиц до  $1-5 \times 10^5$  КОЕ/мл суспензии аэрозоля. Кокковые формы бактерий, используемые в качестве индикаторов микробной загрязненности атмосферного воздуха, тестированы на чувствительность к антибиотикам и наличие признаков патогенности.

### Актуальность

Состав атмосферы Новосибирска находится под влиянием многих антропогенных факторов, включая загрязнение пылевыми частицами, контаминированными вирусами, бактериями, грибами, способными вызвать заболевания людей и животных. Уровень загрязнения атмосферы Новосибирска оценен как «повышенный», отмечена тенденция дальнейшего возрастания загрязнения атмосферы рядом компонентов, в том числе взвешенными частицами биогенного происхождения [1]. При этом состав и свойства микроорганизмов атмосферных аэрозолей городской среды остаются малоизученными.

**Цель работы** — определение концентрации и состава культивируемых микроорганизмов атмосферного воздуха Новосибирска в зимний период, выявление наличия в образцах аэрозолей патогенных кокков как индикаторов микробного загрязнения атмосферы.

### Методы

Для отбора атмосферных аэрозолей в 4 точках Новосибирска, отличающихся антропогенной нагрузкой (2 — в черте города, 2 — в пригородах), использована ежемесячная фильтрация воздуха атмосферы с применением армированных тефлоновых мембран *Sartorius* и компрессоров *Hopar*, позволяющих за 12 ч отобрать 21,6 м<sup>3</sup> воздуха. Для выделения микроорганизмов фильтры с сорбированными частицами аэрозолей помещали в пробирки с 5 мл физраствора, встряхивали 30 мин при комнатной температуре на качалке, затем 2 мин на вортексе. Полученные суспензии высевали на набор питательных сред для изолирования микроорганизмов разных физиологических групп и их исследования. Сравнительная количественная оценка концентрации микроорганизмов в пробе дается как КОЕ/мл суспензии аэрозоля. Определение патогенных свойств изолятов изучали косвенным образом по продукции ферментов агрессии в соответствии с руководством [2]. Чувствительность исследуемых культур к антибиотикам устанавливали диффузионным методом с применением дисков производства НИЦФ (Россия) с концентрацией антибиотиков (мкг/диск): левофлоксацин (5), оксациллин (10), клиндамицин (2), ампициллин (10), ванкомицин (30), линезолид (30), фузидиевая кислота (10).

### Результаты и обсуждение

В период с декабря 2021 г. по февраль 2022 г. исследовано 48 образцов атмосферных аэрозолей, выделено 383 изолята различной таксономической принадлежности, наиболее представленных спорообразующими бактериями, микромицетами и кокками. Концентрация культивируемых микроорганизмов в разных образцах варьировала от нескольких единиц до  $1-5 \times 10^{2-3}$  (КОЕ/мл), на 1–3 порядка отличаясь от аналогичных данных для образцов летнего периода. Соотношение отдельных групп также было изменчивым, закономерности в распределении не наблюдались. Значимую концентрацию кокков наблюдали в семи образцах как в городской среде, так и в пригородах. При выделяемой общей концентрации в образце от  $1,60 \times 10^2$  и до  $5,6 \times 10^3$  кокки могли составлять от 22,92 до 100 % с преобладанием представителей родов *Staphylococcus* и *Micrococcus*. 38 штаммов кокков протестированы на наличие факторов патогенности. Выяснено, что в числе исследованных 28,94 % штаммов обладали гемолизинами, 21,05 — протеазами, 17,79 — липазами, 36,84 % — высоко активной фосфатазной активностью. Желатиназа обнаружена у 21,05 % штаммов, плазмокоагулаза — у 2. Большая часть культур была резистентна к левофлоксацину, оксациллину, клиндамицину, 28,94 % культур проявили устойчивость к ампи-

\* Работа поддержана грантом РФФИ (№ 19-05-50032).

циллину. Выявлены полирезистентные штаммы кокков, устойчивые к 4–5 антибиотикам из 7 использованных, включая ванкомицин, препарат резерва.

### **Выводы**

Повышенная в ряде образцов концентрация кокков, обладающих признаками патогенности и полирезистентностью к антибиотикам, свидетельствует о необходимости постоянного контроля микробной контаминации воздушной среды города. Штаммы с высокой ферментативной активностью могут быть полезны для биотехнологических разработок в качестве продуцентов.

### **Литература**

1. О состоянии и об охране окружающей среды Новосибирской области в 2020 году. Новосибирск, 2021. 176 с.
2. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Кн. I / под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Воиной. М.: БИНОМ, 2008. 1080 с.

**ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ**

Е. А. Рогозина, В. С. Колодязная

*BioTech, Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург*

✉ elenarogozina@itmo.ru

**Аннотация**

Рассмотрено влияние обработки бедренной части мяса страуса ферментным препаратом «Коллагеназа» на формирование органолептических и функционально-технологических свойств мясного сырья.

Рациональное питание должно обеспечивать рост, нормальное развитие и жизнедеятельность человека и способствовать улучшению его здоровья и профилактике заболеваний. Необходимо, чтобы потребляемые продукты содержали все важные составляющие в соотношении и количествах, адекватных ферментным набором пищеварительной системы организма, не иметь в своем составе вредных веществ и избытка энергии [1].

Разнообразные технологические решения в области масштабного производства и применения натуральных добавок открывают новые этапы научно-технического прогресса не только в нашей стране, но и для всего мирового сообщества. Продукция, произведенная по современным технологическим методам, позволит получить тот самый продукт, который будет обладать высокой конкурентной способностью на мировом рынке благодаря гарантиям безопасности и высокой биологической и социально-экономической значимости [2]. Установлено, что большинство продуктов в своем нативном виде не могут удовлетворять потребности человека во всех необходимых пищевых компонентах, минеральных веществах, витаминах, незаменимых аминокислот [3].

В биотехнологиях пищевых продуктов многие процессы, связанные с формированием сенсорных показателей качества, функционально-технологических свойств, структурно-механических характеристик продуктов, протекают с участием различных ферментативных систем. Исследование кинетики ферментативных реакций позволяет получить информацию для выяснения молекулярного механизма действия разных классов ферментов. Их применение более целесообразно и эффективно по сравнению с механическими способами, так как поможет снизить время обработки, трудовые и энергетические затраты, повышается биологическая ценность и функционально-технологические свойства мясопродуктов. Обоснование и выбор ферментных препаратов, отличающихся высокой протеолитической активностью, позволит использовать консервирование холодом мясного сырья с высоким содержанием соединительной ткани и разработать продукты для людей, страдающих нарушением белкового обмена, связанного, в частности, с низкой активностью протеиназ желудочно-кишечного тракта.

Выбор ферментов зависит от их физико-химических свойств и активности, вида мясного сырья, функционально-технологических свойств, химического состава и целевого назначения продуктов. Коллагеназа — протеолитический фермент, который эффективно разрушает пептидные связи в природном коллагене, ингибирует синтез металлопротеаз и предотвращает разрушение протеогликанов, а также коллагена хрящевой ткани, протеолитическая активность которого составляет 130 ПЕ/мг.

В качестве объекта исследования выбрано мясо бедренной части страуса. Цель работы — оптимизировать технологические параметры биомодификации свойств мяса страуса и разработать технологию функциональных продуктов на его основе [4].

Для оптимизации технологических параметров ферментирования фарша использовали метод дробных реплик. В образцах определяли ВУС и содержание аминного азота в зависимости от массовой доли вносимой коллагеназы, продолжительности и температуры выдержки фарша, а также органолептические показатели.

Выбраны следующие параметры ферментирования фарша на основе мяса бедренной части страуса: массовая доля коллагеназы  $C = 0,05$  %, время выдержки фарша  $\tau = 4,5$  ч при температуре  $t = 13$  °С. Дальнейшее увеличение концентрации коллагеназы, времени выдержки и температуры фарша приводит к снижению влагоудерживающей способности, разжижению консистенции фарша и уменьшению общего содержания белка с 22,0 до 14,0 % из-за протеолиза.

**Литература**

1. Позняковский В. М. и др. Физиология питания. Санкт-Петербург: Лань, 2018. 432 с.
2. Forecasting the molecular properties of dietary supplement used in the recipe of foodstuff for diabetes mellitus prevention / V. V. Sadovoy et al. // Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci. 2018. Vol. 9, № 4. P. 1620–1625.
3. Development of functional product enriched with collagen hydrolysate from fish processing waste / E. Kuprina et al. // E3S Web Conf.: ТРАСЕЕ 2019. М., 2020. P. 06026.
4. Optimization of the proteolysis process of connective tissue proteins in ostrich meat / E. A. Rogozina et al. // IOP Conf. Series. St. Petersburg, 2021. P. 012024.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ТРИМЕРА CRF63\_02A ВИЧ-1\***

Н. Б. Рудомётова, А. П. Рудомётов, А. А. Фандо, Н. Д. Ушкаленко, Л. И. Карпенко, Д. Н. Щербаков

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

✉ nadenkaand100@mail.ru

**Аннотация**

Тримерные формы поверхностного гликопротеина ВИЧ-1 находят широкое применение в структурных исследованиях, а также как потенциальная вакцинная платформа. В данной работе представлены результаты по получению и первичной характеристике тримеров рекомбинантной формы CRF63\_02A ВИЧ-1.

На данный момент разработка эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) все еще остается нерешенной задачей. Главная проблема при разработке вакцины против ВИЧ — огромное разнообразие вируса, поэтому эффективная вакцина должна индуцировать иммунный ответ, способный справиться с этим разнообразием [1]. Основной мишенью вируса, на которую нацелены нейтрализующие антитела, является тримерный комплекс gp120/gp41 (Env), который опосредует проникновение вируса в клетки-мишени [2]. В настоящее время стабилизированные тримерные комплексы gp120/gp41 активно используются как в структурных исследованиях, так и в стратегиях вакцинации, направленных на индукцию широконейтрализующих антител (bnAbs) [3].

Таким образом, цель данной работы — получение и характеристика стабилизированного тримера поверхностного гликопротеина рекомбинантной формы CRF63\_02A ВИЧ-1.

В результате исследования на основе генетического варианта CRF63\_02A ВИЧ-1 с использованием биоинформатических ресурсов проведен дизайн тримера с включением следующих модификаций: межмолекулярной дисульфидной связи (SOS, A501C-T605C) для связывания gp120 и gp41; улучшенного сайта расщепления фурином (R6); точечной замены I559P, способствующей сборке субъединиц gp41 в конформацию до слияния; удаления MPER-области, трансмембранного и цитоплазматического доменов для лучшей экспрессии; добавления 6×His на С-конце для последующей очистки. После этого оптимизировали кодонный состав гена для экспрессии в клетках млекопитающих; синтез нуклеотидной последовательности проведен коммерческой фирмой «ДНК-синтез» (Москва). Данный ген клонирован в составе интеграционного вектора pVL3. Затем для получения стабильного продуцента осуществляли трансфекцию культуры клеток CHO-K1 плазмидами pVL3-HIVRU и pCMV(CAT) T7-SB100, кодирующую транспозазу SB100 — фермент, обеспечивающий вырезание и интеграцию интересующего гена в геном клеточной линии. Через несколько дней в культуральную среду добавляли селективный антибиотик пурамицин (InvivoGen, США), ген устойчивости к которому входит в состав плазмиды pVL3-HIVRU, и осуществляли селекцию устойчивых клонов, затем поликлональную клеточную культуру рассевали и анализировали на способность продуцировать тримеры. Для подтверждения экспрессии тримеров поверхностного гликопротеина рекомбинантной формы CRF63\_02A проводили иммунохимический анализ (дот-блот, вестерн-блот) с моноклональными антителами к 6×His и сыворотками «ВИЧ+». С помощью иммунохимического анализа показано, что синтезируемые в клетках CHO-K1 рекомбинантные тримеры могут специфически распознаваться как моноклональными антителами к 6×His, так и сыворотками «ВИЧ+». Дополнительно для изучения антигенных свойств полученных тримеров проведен ИФА с панелью сывороток ВИЧ-положительных доноров. Показано, что тримеры специфически распознаются и сохраняют свою антигенную структуру.

Таким образом, полученные тримеры могут быть использованы для исследования их структурных особенностей в комплексе с bnAbs, а также иммуногенных свойств.

**Литература**

1. Sliepen K., Han B., Bontjer I. et al. Structure and immunogenicity of a stabilized HIV-1 envelope trimer based on a group-M consensus sequence // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–16.
2. Medina-Ramírez M., Sanders R. W., Sattentau Q. J. Stabilized HIV-1 envelope glycoprotein trimers for vaccine use // *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2017. Vol. 12, № 3. P. 241–249.
3. Derking R., Sanders R. W. Structure-guided envelope trimer design in HIV-1 vaccine development: a narrative review // *J. Int. AIDS Soc.* 2021. Vol. 24. e25797.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

© Н. Б. Рудомётова, А. П. Рудомётов, А. А. Фандо, Н. Д. Ушкаленко, Л. И. Карпенко, Д. Н. Щербаков, 2022

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ПРОДУКТА ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

М. В. Руснак<sup>1</sup>, А. А. Кондратенко<sup>2</sup>, Д. В. Товпеко<sup>2</sup>, Л. И. Калюжная<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

✉ Kondraa24@gmail.com

### Аннотация

Изготовленный методом децеллюляризации тканеинженерный продукт из пуповины человека при анализе его состава показал сохранность важнейших компонентов, способствующих эффективному заживлению ран. Отсутствие необходимости в специальных условиях хранения делает продукт привлекательным для использования.

### Введение

Поиск эффективных стратегий заживления ран — актуальная задача современной медицины. В то время как клеточный компонент пуповинной крови человека был предметом обширных исследований в течение многих лет, внеклеточный матрикс Вартонова студня пуповины является не менее ценным материалом для нужд тканевой инженерии и регенеративной медицины [1].

### Материалы, методы и результаты

Тканеинженерный продукт изготовлен из твердой слизистой соединительной ткани пуповины человека методом децеллюляризации 0,05%-м раствором додецилсульфата натрия. Плотно упакованный стерильный лиофилизированный готовый продукт хранили в течение 2 лет при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Показана гетеропористость тканеинженерного продукта (JEOLJSM-639 OLA): Me; Q1-Q3; 71,43; 47,62–95,24  $\mu\text{m}$ . Содержание ДНК в продукте 17,73; 15,74–29,52 нг/мг сухого веса (ДНК-технологии, Россия; Nanodrop, США). В равном количестве лиофилизированной нативной пуповины количество ДНК составило 531,42; 663,02–343,51 нг/мг сухого веса. Основу продукта составляет структурный коллаген, что было показано методами трансмиссионной электронной микроскопии (Merlin, CarlZeiss, Germany) и инфракрасной спектроскопии (Bruker Alpha, Germany). Присутствие в составе продукта сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов подтверждали окрашиванием гистологических препаратов тканеинженерного продукта альциановым синим (Биовитрум, Россия) при pH 2,5 и 1,0. В качестве контроля использовали препараты, предварительно обработанные раствором гиалуронидазы (Лидаза, Россия) при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч. Биосовместимость тканеинженерного продукта исследовали на 20 беспородных белых мышках обоего пола массой  $20,5 \pm 3,2$  г. Образцы 0,01 г были имплантированы под кожу. Спустя три недели животных выводили из эксперимента, а имплантаты вместе с окружающими тканями фиксировали в 10%-м формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 0,4 мкм окрашивали по Маллори (Биовитрум, Россия). Заживление разрезов кожи происходило без признаков воспаления и отека. Не найдено образования волокнистой капсулы вокруг имплантатов и скопления многоядерных гигантских клеток. Обнаружено наличие грануляционной ткани вокруг тканеинженерного продукта с большим количеством зрелых капилляров, типичной для нормальной реакции заживления ран. Инфильтрация веретенообразных фибробластов выявлена на периферии грануляционной ткани.

### Обсуждение и выводы

Строма пуповины человека — непревзойденный источник белков внеклеточного матрикса (коллагены I, III, IV, VI, VII типов), ламинина, гиалуроновой кислоты, гепарансульфата, проангиогенных факторов (VEGF, PDGF, EGF, bFGF, HGF) [2]. Неиммуногенность тканеинженерного продукта из пуповины человека и сохранность в нем важнейших регенеративных компонентов достигнуты благодаря качественной щадящей децеллюляризации. Активная неоваскуляризация зоны имплантации продукта без массивной воспалительной реакции свидетельствует о его регенеративных возможностях и отсутствии у него иммуногенных свойств. Возможность длительного хранения тканеинженерной бесклеточной конструкции из высокорегенеративного гомологичного биоматериала является еще одним важным (помимо неиммуногенности, регенеративного компонентного состава и пористости) преимуществом изготовленного продукта.

### Литература

1. Bakhtyar N., Jeschke M. G., Mainville L. et al. Acellular Gelatinous Material of Human Umbilical Cord Enhances Wound Healing: A Candidate Remedy for Deficient Wound Healing // *Front. Physiol.* 2017. Vol. 8. P. 200.
2. Ramzan F., Ekram S., Frazier T. et al. Decellularized Human Umbilical Tissue Derived Hydrogels Promote Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells // *Bioengineering.* 2022. Vol. 9. P. 239.

## ARTIFICIALLY STRUCTURED POLYMICROBIAL AGGREGATES FOR APPLICATIONS IN PETROLEUM BIOTECHNOLOGY

I. Rybkin<sup>1</sup>, A. Humam<sup>2</sup>, M. Orlov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Aramco Innovations LLC, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*Saudi Aramco, Dhahran, Kingdom of Saudi Arabia*

✉ iaroslav.rybkin@aramcoinnovations.com

### Abstract

Bacterial surface carries a negative charge, which can be altered by electrostatic deposition of oppositely charged polyelectrolytes. This alteration enables assembly of different microbial cells in cellular aggregates, which can be used for multiple applications. This work highlights state-of-the-art solutions to perform the charge alteration and demonstrates several cases for using artificially structured microbial aggregates in petroleum biotechnology.

Bacteria are widely used in oil and gas production for wastewater treatment, biocorrosion mitigation, bioremediation and biodegradation. Besides, they might be applied in synthesizing high value products from crude oil with a high specificity of chemical reactions. These applications result in a rapid development of the petroleum biotechnology, which can provide benefits for waste reduction, sustainability development and opens new pathways for chemicals' synthesis.

Since biodegradation and synthesizing high value products are multi-step processes, they require the use of various bacteria to consequently alter the compound of interest into the final product. Therefore, it calls for the development of methods for structuring bacterial communities that would allow organized transfers and conversions of the compounds among cells.

Naturally, bacteria tend to form multispecies cellular aggregates called biofilms. Being entrapped within biofilms, bacteria establish multiple biogeochemical cycles through cross-feeding, which allow organized transfers of the compounds. The possibility to establish a biogeochemical cycle is determined by the appropriate spatial placement of a particular bacterium and its metabolic capability with other compatible microbes.

Although bacteria have many metabolic pathways to cooperate with other cells, the lack of initial conditions promoting attachment, prevents cooperation and formation of closed biogeochemical cycles. If we provide conditions to attach the cells together and make them compatible, it would be possible to assemble different microbes within one cycle similarly as in nature, but specifically structured.

Since bacterial surface is mainly negatively charged, it allows to alter the surface charge by depositing oppositely charged polyelectrolytes. As a result, it enables strong electrostatic interaction between oppositely charged cells or cell and surfaces. However, complexity of the cell wall structure, fast division rates and physiological differences between cells, significantly complicate deposition of polyelectrolytes. The latter can be also toxic to bacteria and cause uncontrollable aggregation. In addition, each polyelectrolyte layer, deposited on the cellular surface, creates a physical layer restricting the cell growth. Therefore, it is needed to summarize available findings and carefully design the optimal solution for modifying the cell surface and structuring the cells in the abovementioned cycles.

This work summarizes existing knowledge about the methods of electrostatic modification of the bacterial cell surface for structuring microbial communities. In particular, it shows that the surface of bacterial cells can be efficiently modified with polyelectrolytes without causing any toxicity to bacteria. The surface modification operation was found to significantly prolong the attachment of cells on inanimate surfaces over a long period of time. It also allowed producing bacterial aggregates that are composed of various cells. These aggregates possess a great potential for applications in oil and gas to reduce the attachment of unwanted microbes and to treat persistent pollutants in wastewater.

## NITROGEN-FIXING POTENTIAL OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM POTATO PLANTS

Z. R. Sabirova<sup>1</sup>, A. A. Tuama<sup>1,2</sup>, O. V. Ivankova<sup>1</sup>, N. S. Karamova<sup>1</sup>, Z. Stasevski<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

<sup>2</sup>University of Diyala, Baquba, Iraq

<sup>3</sup>Tatar Institute of Agriculture — Federal Research Center Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

✉ sabirovazar@mail.ru

**Abstract**

Endophytes are microorganisms that colonize internal plant tissues without causing negative effect on the host. Two bacterial endophytes isolates found from the leaves and roots of potato plants showed nitrogen-fixing potential during growth in a medium without sources biologically useful forms of nitrogen. The data found indicate the benefits of using bacterial endophytes isolates studied for plant growth promotion.

Endophytic microbes are a promising object of research focused at biological approaches for improving crop yield. Endophytes have been reported to support growth of plants by producing phytohormones, siderophores, solubilizing potassium, nitrogen fixation, as well as showing antagonistic activity against phytopathogenic microorganisms [1, 2].

Nitrogen is one of the essential elements necessary for all organisms. Most of the nitrogen (about 78 %) is in the gaseous state ( $N_2$ ) in the Earth's atmosphere. Diazotrophic microorganisms have a unique ability to convert  $N_2$  into forms that plants can absorb through their root systems. It has been shown that nitrogen-fixing endophytes can increase the availability of nitrogen to their hosts and allow plants to develop in a nitrogen-limited soil environment. Some endophytic bacteria exhibit a significant nitrogen-fixing ability, not inferior in this even to bacteria of the genus *Rhizobium* [3, 4].

The aim of this work was to evaluate the nitrogen-fixing potential of endophytic bacteria isolates obtained from potato plants.

We used two endophytic bacteria isolates found in the leaves and roots of potato plants from the collection Tatar Institute of Agriculture (Kazan, Russia).

The ability of bacteria to fix atmospheric nitrogen into a biologically useful form was investigated using Burke's medium.

Screening of nitrogen-fixing activity in Burke's agar medium showed that both isolates were able to grow in this medium, and their growth rate was approximately the same as in Burke's medium with ammonium sulfate. Comparative analysis the growth of isolates in a liquid Burke's medium and in a medium with ammonium sulfate showed noticeable increase in biomass of isolate 1 in both variants. Isolate 2 showed a gradual but comparatively smaller increase in biomass when cultured in Burke's medium.

The results obtained indicate the nitrogen-fixing potential of the studied isolates and ability to grow in the absence of bound nitrogen.

**References**

1. Fadiji A. E., Babalola O.O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8 (467).
2. Bohra N., Singh R. K., Jain R. et al. Endophytic bacteria for plant growth promotion. // Singh A. K., Tripathi V., Shukla A. K., Kumar P. (eds) Bacterial endophytes for sustainable agriculture and environmental management. Springer, Singapore, 2022.
3. Montañez A., Blanco A. R., Barlocco C. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro* // Appl. Soil Ecol. 2012. Vol. 58. P. 21–28.
4. Frank A. C., Carrell A. A., Carper D. et al. Aboveground  $N_2$ -fixing bacterial endophytes in subalpine conifers: A novel pathway for ecosystem acquisition of new nitrogen? // Conference: 99<sup>th</sup> ESA Ann. Convention, Sacramento, August 14.2014. COS, 2014. P. 91–92.

## ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ГЕТЕРОЗИГОТНОГО НОСИТЕЛЬСТВА МУТАЦИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ЧАСТЫЕ РЕЦЕССИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ), С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗРАБОТАННОГО ДНК-МИКРОЧИПА НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

М. Т. Саввина<sup>1</sup>, Н. Р. Максимова<sup>1</sup>, И. Н. Лебедев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, Якутск

<sup>2</sup>Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

✉ mira@savv.in

### Аннотация

Человеческая популяция разделена на множество изолированных групп — генетических изолятов. Они на протяжении веков живут обособленно, проявляя меньшую генетическую изменчивость. До недавнего времени таких групп было много, некоторые из них существуют до сих пор. Один из ее представителей — популяция якутского этноса Республики Саха (Якутия), демонстрирующая высокую распространенность редких аутосомно-рецессивных заболеваний, основной причиной которых является эффект основателя [1]. С использованием разработанного нами ДНК-микрочипа мы оценили частоты гетерозиготного носительства пяти моногенных заболеваний, наиболее распространенных в Республике Саха (Якутия), в популяционной выборке из здоровых индивидов. Результаты верифицированы путем генотипирования с помощью методов ПЦР-ПДРФ и ПЦР в реальном времени. Чувствительность и специфичность тестирования с применением ДНК-микрочипа составили 99 и 100 % соответственно.

### Материалы и методы

Олигонуклеотидные зонды, соответствующие мутациям 4582\_4583insT в CUL7, с.5741G>A в NBAS, с.806C>T в DIA1, с.1090G>C в FAN., с.-23+1G>A в GJB2, вызывающие 3-М- и SOPH-синдром, метгемоглобинемию типа 1, тирозинемию типа 1, несиндромальную глухоту типа 1А (DFNB1) соответственно, а также зонды дикого типа были нанесены на стеклянный слайд с альдегидным покрытием. Анализ включает двухэтапную мультиплексную ПЦР, вторая из которых асимметрична с получением одноцепочечных продуктов ПЦР, меченных флуоресцентным красителем Cy5, с последующей гибридизацией с олигонуклеотидными зондами [2].

### Результаты

Разработан ДНК-микрочип низкой плотности и проведено генотипирование 120 здоровых индивидов якутской этнической группы на наличие мажорных мутаций, вызывающих 3-М- и SOPH-синдром, мутацию с.806C>T в гене DIA1 (метгемоглобинемия 1-го типа), несиндромальную глухоту типа 1А (DFNB1), тирозинемию 1-го типа. Результаты генотипирования демонстрируют высокую частоту всех пяти исследованных генетических вариантов: мутация 4582\_4583insT в гене CUL7 (3-М-синдром) — 1:25, мутация с.5741G>A в гене NBAS (SOPH-синдром) — 1:50, метгемоглобинемия 1-го типа — 1:25, мутация с.-23+1G>A в гене GJB2 (DFNB1) — 1:11, с.1090G>C в FAN (тирозинемию 1-го типа) — 1:100.

### Заключение

Полученные результаты демонстрируют высокую частоту гетерозиготного носительства вышеуказанных заболеваний и свидетельствуют об острой необходимости их профилактики путем внедрения программ таргетного молекулярно-генетического скрининга населения. Разработанный ДНК-микрочип может быть предложен в качестве альтернативного высокоспецифичного экономически эффективного инструмента для проведения скрининга на гетерозиготное носительство и генетической диагностики в Республике Саха (Якутия).

### Литература

1. Пузырев В. П., Максимова Н. Р. Наследственные болезни у якутов // Генетика. 2008. Т. 44, № 10. С. 1317–1324.
2. Саввина М. Т. и др. Олигонуклеотидный биочип для диагностики 3-М-синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1-го типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии 1-го типа, наследственной несиндромальной глухоты 1А типа // Мед. генетика. 2019. Т. 18, № 9. С. 24–33.



КУЛЬТУРА КЛЕТОК *PHLOJODICARPUS VILLOSUS*А. А. Садыков<sup>1</sup>, М. Т. Ханды<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток<sup>2</sup>ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток

✉ cagblk08@gmail.com

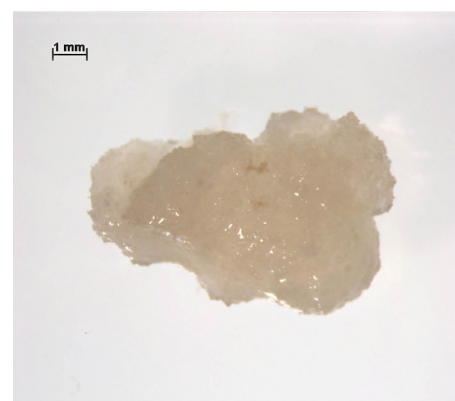
**Аннотация**

*Phlojodicarpus villosus* (Turcz. ex Fisch. & С.А. Mey.) Turcz. ex Ledeb. — продуцент кумаринов и флавоноидов. В настоящей работе из листьев *P. villosus* на модифицированной среде MS с фитогормонами 2,4-Д и БАП получена каллусная культура клеток, которая характеризовалась бледно-бежевым цветом, скоплением рыхлых клеток и водянистой текстурой. Каллус *P. villosus* в последующем может быть использован для получения редких кумаринов.

Неорганизованный рост редко наблюдается в природе, но в условиях *in vitro* кусочки целых растений формируют агрегаты клеток, которые лишены какой-либо узнаваемой структуры и содержат лишь ограниченное количество специализированных и дифференцированных клеток, встречающихся в интактном растении [1]. Подобные неорганизованные агрегаты клеток называются культурами клеток растений, представляют интерес для крупномасштабного производства растительного сырья, содержащего ценные биологически активные вещества, и не подвержены влиянию неконтролируемых изменений окружающей среды.

Вздутоплодник мохнатый (*Phlojodicarpus villosus* (Turcz. ex Fisch. & С.А. Mey.) Turcz. Ex Ledeb.) — многолетнее поликарпическое стержнекорневое травянистое растение, принадлежащее к малоисследованному роду *Phlojodicarpus* семейства Ариáceе [2, 3]. Представители данного рода накапливают кумарины и флавоноиды, которые обладают спазмолитическим, противоопухолевым и антибактериальным действием [4]. *P. villosus* — плейстоценовый реликт и включен в Красные книги Республики Коми (статус 1), Свердловской области (статус 3), Ханты-Мансийского автономного округа (статус 1) и в приложение к Красной книге Пермского края [5–8]. Таким образом, *P. villosus* является перспективным объектом для получения культур клеток *in vitro* как продуцент редких кумаринов и реликтовый вид.

В настоящей работе впервые в мире получена культура клеток *P. villosus*. Для индукции каллусогенеза в качестве эксплантов использованы листья и корни *P. villosus*, верхоянской популяции (окрестности с. Сегян Кюель, Кобяйский улус, Республика Саха (Якутия) август 2021 г.). Стерилизацию эксплантов проводили в течение 5–10 мин в 0,2%-м растворе диоксида и затем трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. После стерилизации экспланты помещали на питательную среду Мура-сиге и Скуга (MS), приготовленную по стандартной прописи [9] с добавлением пептона (0,1 г/л), мезоинозита (0,1 г/л) и сахарозы (30 г/л). Проращивание осуществляли при температуре 25 ± 1 °С. Использовали четыре варианта сред с различным сочетанием ауксинов и цитокининов. Каллусогенез получили на среде с гормонами: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) (1,0 мг/л) и 6-бензиламинопурином (БАП) (0,5 мг/л). Данный каллус характеризовался бледно-бежевым цветом, скоплением рыхлых клеток и водянистой текстурой (см. рисунок).

Каллус *Phlojodicarpus villosus***Литература**

1. Edwin F. George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk. Plant Propagation by tissue culture. 3rd ed. Springer Dordrecht, 2008. С. 502.
2. Пименов М.Г. Семейство Ариáceе Lindl., Umbelliferae Juss. // Конспект флоры Азиатской России. Сосудистые растения. Новосибирск: СО РАН, 2012. С. 281–296.
3. Валуйских О. Е., Шадрин Д. М. Филогенетическое положение *Phlojodicarpus villosus* (Ариáceе) на основе анализа последовательностей ITS и trnH-psbA // Turczaninowia. 2021. Т. 24, № 4. С. 12–22.
4. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae — Ариáceе / под общ. ред. А.Л. Буданцева: КМК, 2010. 602 с.
5. Красная книга Ханты-Мансийского автономного округа — Югры. Екатеринбург, 2013. 460 с.

6. Красная книга Свердловской области: животные, растения, грибы. Екатеринбург: ООО «Мир», 2018. 450 с.
7. Красная книга Республики Коми / под ред. А. И. Таскаева. Сыктывкар, 2009. 791 с.
8. Красная книга Пермского края. URL: <http://redbook.permecology.ru>.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15 (3). P. 473–497.

## ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ дцРНК ПРОТИВ Y-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ НА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЮ, НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУНИТЕТ И МЕТАБОЛИЗМ поли(АДФ-РИБОЗЫ) В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ

В. О. Самарская<sup>1</sup>, Н. А. Спеченкова<sup>1</sup>, Н. В. Маркин<sup>2</sup>, Т. П. Супрунова<sup>2</sup>,  
С. К. Завриев<sup>1</sup>, Н. О. Калинина<sup>1,4</sup>, М. Э. Тальянский<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup>ООО «Дока — Генные технологии», Рогачево

<sup>3</sup>The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, UK

<sup>4</sup>НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва

✉ viktoriya.samarskaya2012@yandex.ru

### Аннотация

Экзогенное нанесение дцРНК-YVK на листья картофеля ингибирует репликацию вируса, сопровождается накоплением YVK-специфических малых интерферирующих РНК, маркера РНК-интерференции, и повышением уровня транскриптов генов неспецифического иммунитета, а также способно увеличивать продукцию ключевого фермента метаболизма поли(АДФ-рибозы) — поли(АДФ-рибоза) гликогидролазы, предполагаемого позитивного регулятора ответа на биотический стресс.

РНК-интерференция (РНКи), или сайленсинг РНК, — механизм регуляции экспрессии генов, способствующий эффективной защите растений от вирусной инфекции [1]. Устойчивая и экологически чистая технология SIGS, основанная на опрыскивании растений экзогенной дцРНК, успешно применяется для индукции устойчивости к различным вирусам у широкого круга сельскохозяйственных культур [2]. дцРНК также является элиситором иммунитета, индуцируемого молекулярными паттернами, ассоциированными с патогеном (РТИ). В отличие от РНКи, дцРНК-индуцированная РТИ не зависит от последовательности дцРНК [3].

Способность дцРНК индуцировать защиту от Y-вируса картофеля (YVK штамм O) тестировали на растениях *Solanum tuberosum* с использованием дцРНК, гомологичной консервативному фрагменту гена репликазы YVK длиной 918 п. н. дцРНК-YVK наносили на листья растений в присутствии абразива (целит) и поверхностно-активного вещества (Неон 99) с помощью атомайзера и через 24 ч заражали YVK. Обработку растений дцРНК-YVK повторяли еженедельно. Применение дцРНК-YVK приводило к эффективному ингибированию репликации вируса в растениях по сравнению с необработанным дцРНК контролем (рис. 1, А).

Показано, что экзогенное нанесение дцРНК-YVK на листья картофеля приводит к накоплению YVK-специфических малых интерферирующих РНК, маркера РНК-интерференции, и увеличивает экспрессию ряда классических генов, связанных с РТИ, таких как *WRKY29*, *RbohD*, *EDS5*, *SERK3* и *PR-1b*, относящихся к неспецифическому иммунитету, а также сопровождается усилением отложения каллозы. Однако РНК-интерференция, очевидно, является главным механизмом, обеспечивающим устойчивость растения к вирусной инфекции, поскольку неспецифический механизм защиты оказался не способным ингибировать репликацию неродственного YVK-вируса — X-вируса картофеля (рис. 1, В).

Поли-АДФ-рибозилирование (РАРилирование) белков с помощью поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) и удаление этих фрагментов из белков с применением поли(АДФ-рибоза) гликогидролазы (PARG) является важным механизмом, влияющим на иммунитет растений [4]. PARG считается положительным регулятором толерантности к биотическому стрессу. Анализ экспрессии генов *PARP* и *PARG* методом RT-qPCR в образцах картофеля показал, что ни сама дцРНК-YVK, ни вирусы (YVK или XVK) в присутствии или в отсутствие дцРНК-YVK не влияли на уровень экспрессии гена *PARP1* (рис. 2). Напротив, экспрессия гена *PARG* значительно повышалась (более чем в 10 раз) при обработке растений только YVK-дцРНК по сравнению с контролем (необработанными растениями) (см. рис. 2). Вирусная инфекция (YVK и XVK) также приводила к увеличению экспрессии гена *PARG*, но в меньшей степени, чем только одна YVK-дцРНК. Обработка растений YVK-дцРНК в условиях вирусной инфекции (YVK и XVK) сопровождалась

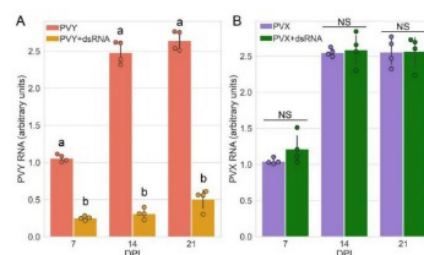


Рис. 1. Накопление РНК YVK (А) и РНК X-вируса картофеля (В) (определено методом RT-qPCR) в системно инфицированных листьях растений картофеля, необработанных или предварительно обработанных дцРНК-YVK на 7-й, 14-й и 21-й дни после начала инфекции

снижением уровней экспрессии гена *PARG* практически в два раза до уровней экспрессии, выявляемых в условиях вирусной инфекции (см. рис. 2, B). Сходным образом менялось и количество PAR, продукта гидролиза PARилированных белков.

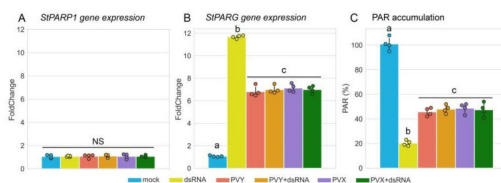


Рис. 2. Уровни экспрессии генов *PARP* и *PARG*, установленные методом RT-qPCR, и содержание поли(АДФ-рибозы) (PAR), определенное ИФА, в растениях картофеля без обработки дцРНК-УБК и после нее (контроли) или в условиях инфекции вирусами УБК и ХБК с обработкой дцРНК-УБК и без нее

Предполагается, что разработка подходов, способных объединить выявленные механизмы, индуцируемые дцРНК, а именно РНК-интерференцию, неспецифический иммунитет и регуляцию метаболизма поли(АДФ-рибозы), может быть перспективной для повышения уровня защиты растений от вирусных инфекций.

### Литература

1. Yang Z., Li Y. Dissection of RNAi-Based Antiviral Immunity in Plants // *Curr. Opin. Virol.* 2018. Vol. 32. P. 88–99.
2. Dubrovina A. S., Kiselev K. V. Exogenous RNAs for Gene Regulation and Plant Resistance // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. P. 2282.
3. Niehl A., Heinlein M. Perception of Double-Stranded RNA in Plant Antiviral Immunity // *Mol. Plant Pathol.* 2019. Vol. 20. P. 1203–1210.
4. Feng B., Liu C., de Oliveira M. V. V. et al. Protein Poly(ADP-Ribosyl)ation Regulates Arabidopsis Immune Gene Expression and Defense Responses // *PLoS Genet.* 2015. Vol. 11. e1004936.

## ПРИМЕНЕНИЕ БИОКОНЬЮГАТОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА В КАЧЕСТВЕ ТУШИТЕЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ГОМОГЕННОЙ СИСТЕМЕ ИММУНОДЕТЕКЦИИ ОХРАТОКСИНА А\*

А. В. Самохвалов, К. В. Серебренникова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев

*Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

✉ 03alexeyamohvalov09@gmail.com

### Аннотация

Работа посвящена исследованию применения наночастиц золота (НЧЗ) в биоаналитических системах, основанных на тушении флуоресценции метки в ходе межмолекулярных взаимодействий. Изучено влияние параметров НЧЗ и их конъюгатов с антителами на тушение флуоресцентной метки, ковалентно присоединенной к охратоксину А (ОТА). Полученные результаты использовались для детекции ОТА, предел обнаружения составил 0,02 нг/мл.

Наночастицы золота (НЧЗ) широко применяются в биоаналитических системах, что обусловлено их стабильностью, простотой модификации и интенсивной окраской [1]. Широкая полоса поглощения в районе 520 нм позволяет использовать их не только как колориметрическую метку, но и как тушитель флуоресценции. Ферстеровский перенос энергии флуоресценции (FRET) возникает при пересечении спектров флуоресценции флуорофора и поглощения тушителя и их сближении. FRET наиболее выражен, когда расстояние не превосходит 10–20 нм (в зависимости от природы реагентов) [2]. Этот эффект позволяет реализовывать простые системы быстрой гомогенной иммунодетекции различных соединений. Цель проведенного исследования — оценка влияния параметров конъюгатов НЧЗ с антителами (IgG) на характеристики FRET-иммуноанализа с их использованием. В качестве детектируемого антигена рассматривался охратоксин А — распространенный токсичный метаболит грибов, контаминирующий продукты питания.

Цитратным методом синтезированы препараты НЧЗ со средними диаметрами  $21 \pm 4$  и  $33 \pm 3$  нм (по данным просвечивающей электронной микроскопии) и максимумами поглощения 520 и 525 нм соответственно; карбодиимидным методом — конъюгат ОТА с аминотилфлуоресцеином (ОТА-ФЛУ,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  498/517 нм). Конъюгаты НЧЗ с IgG, специфическими и неспецифическими (отрицательный контроль) к ОТА, получены посредством физической сорбции IgG (10 мкг/мл) на поверхность НЧЗ ( $OP_{max} = 1$ ) в 2,5 мМ боратном буфере, pH 8,5. Связывание антител и НЧЗ с диаметрами 21 и 33 нм привело к bathochromному сдвигу пиков поглощения до 525 и 530 нм соответственно.

Изучено тушение флуоресценции при разных соотношениях ОТА-ФЛУ и НЧЗ-IgG. В таблице в качестве примера представлены данные эксперимента для конъюгатов специфических и неспецифических IgG и НЧЗ с диаметром 33 нм.

### Зависимость тушения флуоресценции ОТА-ФЛУ от оптической плотности конъюгатов НЧЗ с диаметром 33 нм

Оптическая плотность НЧЗ	ОТА-ФЛУ, нМ					
	Неспецифические IgG			Специфические IgG		
	7	3,5	1,75	7	3,5	1,75
Тушение флуоресценции в % от исходной						
1	27	27	18	56	59	58
0,5	18	22	14	40	46	48
0,25	9	13	9	16	27	37
0,12	1	5	8	12	13	18
0,06	-2	2	0	-1	6	4
0,03	-7	-1	-2	2	2	2

Неспецифическое тушение наблюдается при ОП НЧЗ более 0,1 и обусловлено частичным поглощением средой возбуждающих и испускаемых лучей [3]. При ОП = 1 неспецифическое тушение не превышает 27 % и наименее выражено при концентрации ОТА-ФЛУ 1,75 нМ — 20 %. Для специфических конъюгатов за счет FRET-эффекта тушение метки достигает 59 % (ОП = 1). Разность специфического и неспецифического тушения максимальна для конъюгата с НЧЗ диаметром 33 нм и при 1,75 нМ ОТА-ФЛУ. Показано, что использование

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20155).  
© А. В. Самохвалов, К. В. Серебренникова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев, 2022

дополнительного стабилизатора — овалбумина — снижает дрейф значений разности флуоресценций во времени.

Стабилизированный конъюгат НЧЗ-IgG применялся для реализации гомогенной FRET-системы, основанной на конкуренции между меченым и нативным (потенциально содержащимся в пробах) ОТА. По мере увеличения концентрации ОТА наблюдалось восстановление флуоресценции. Предел обнаружения ОТА в пробах вина — 0,02 нг/мл, рабочий диапазон системы — 0,09–3,12 нг/мл. Время анализа составило 45 мин.

В результате проведенного исследования продемонстрирована эффективность применения пары флуоресцеин (донор) — НЧЗ (акцептор) в FRET иммуноаналитических системах. При этом предпочтительны НЧЗ большего размера. Разработана FRET-система, обеспечивающая детекцию ОТА в пробах вина в концентрациях до 0,02 нг/мл.

### **Литература**

1. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. 318 с.
2. Panuganti S. et al. Distance Dependence of Förster Resonance Energy Transfer Rates in 2D Perovskite Quantum Wells via Control of Organic Spacer Length // J. Am. Chem. Soc. 2021. Vol. 143 (11). P. 4244–4252.
3. Fonin A. V. et al. Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction // PLoS ONE. 2014. Vol. 9 (7). Art. e103878.

## МАТРИКСНАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА 9 КАК ФАКТОР РЕГЕНЕРАТОРНОЙ СПОСОБНОСТИ КОЖИ У ПОСТРАДАВШИХ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ

П. А. Селиванов

*3-й Военный госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации, Санкт-Петербург*

✉ olliwoood@gmail.com

### Аннотация

Уточнена роль одного из представителей семейства матриксных металлопротеиназ (ММП) — ММП9 в отношении успешности проводимого хирургического лечения у пострадавших с ожоговой травмой. Определены рекомендуемые пороговые значения ММП9 при свободной аутодермопластике (САДП) у пострадавших с ожоговой травмой.

### Введение

Ведущим методом хирургического лечения ожоговой травмы (ОТ) является метод свободной аутодермопластики (САДП). Успешность приживления кожного лоскута зависит от многих факторов, таких как сроки оперативного вмешательства, площадь пересаживаемого кожного лоскута, иммунная реактивность организма в момент проведения САДП. Иммунная система не только координирует взаимодействия иммунокомпетентных клеток, но и участвует в регуляции репаративной активности в области поражения. Известно о регуляции иммунной системой процессов ремоделирования, реконструкции экстрацеллюлярного матрикса, неоангиогенеза за счет работы семейства цинковых энзимов — матриксных металлопротеиназ (ММП). Однако также существуют данные о двойственности влияния ММП за счет способности расщеплять латентный TGF- $\beta$ , что, в свою очередь, служит фиброгенным фактором и впоследствии играет негативную роль в процессе репарации поврежденных тканей. Цель исследования — изучение концентрации представителя семейства матриксных металлопротеиназ (ММП9) у пострадавших с ожоговой травмой, которым проводилась операция САДП.

### Материал и методы

В исследовании приняли участие 99 человек. Критериями включения в группу обследованных пациентов ( $n = 64$ ) с ОТ стали: возраст от 18 до 65 лет, ОТ I-IIIАВ степени тяжести, глубокие ожоги кожи на площади не менее 1 % поверхности тела. Критерии исключения: онкологические заболевания, тяжелые иммунодефицитные состояния в анамнезе, заболевания с поражением кожных покровов. Группу сравнения ( $n = 35$ ) составили условно здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет, критерии исключения аналогичны таковым в основной группе. ММП9 изучали методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов «Human MMP9 ELISA Kit» R&D Systems (США). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Microsoft Office Excel 2016», пакета Statistica 12.0 («StatSoft», США).

### Результаты

Все пострадавшие были разделены на две группы с различным исходом САДП: с полным приживлением аутотрансплантата ( $n = 25$ ) и частичным лизисом аутотрансплантата ( $n = 28$ ).

С помощью анализа динамики изменения концентрации ММП9 в нашем исследовании выявлено двукратное снижение содержания ММП9 от момента получения травмы до дня накануне операции в группе с полным приживлением. В группе с неблагоприятным исходом САДП снижение концентрации ММП9 было незначительным. Это указывает на то, что высокие уровни ММП9 являются неблагоприятным фактором, влияющим на исход САДП.

Для уточнения порогового значения ММП9 в отношении благоприятного исхода САДП проведен ROC-анализ (82 % специфичность, 100 % чувствительность,  $p < 0,001$ ). Таким образом, накануне операции в отношении благоприятного прогноза исхода САДП концентрация ММП9 не должна превышать 41 нг/мл. Полученные нами пороговые значения позволяют использовать их для прогнозирования исхода аутотрансплантации, а также дополняют представление о динамике данных молекул, принимающих участие в процессах ремоделирования тканей.

### Заключение

Концентрация ММП9 ниже 41 нг/мл накануне проведения САДП является благоприятной в отношении прогноза исхода оперативного вмешательства. Расширение алгоритма обследования пострадавших накануне планируемой САДП за счет включения исследования ММП9 повысит эффективность и качество лечебных мероприятий.

## ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОЛЮБИЛИЗАЦИЮ ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА ШТАММОМ *PANTOEA BRENNERI* 3.5.2\*

Л. В. Сокольникова, Д. С. Бульмакова, А. Д. Сулейманова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ lidasok00@mail.ru

### Аннотация

Различные источники макроэлементов в среде культивирования влияют на способность штамма *Pantoea brenneri* 3.5.2 высвобождать фосфаты из труднодоступного трикальцийфосфата. Глюкоза и сульфат аммония явились наилучшими источниками углерода и азота соответственно для солюбилизации фосфатов штаммом *P. brenneri* 3.5.2.

Известно, что бактерии рода *Pantoea* способны высвобождать фосфор из труднодоступных органических и неорганических соединений [1], а также обладают другими PGP-эффектами [2], благодаря чему могут использоваться в качестве биоудобрений. Несмотря на то что данные микроорганизмы высвобождают достаточно большое количество фосфатов на среде NBRIP с  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , актуальным является изучение их потенциала растворения фосфатов при различных источниках макроэлементов в питательной среде, что было бы важно для разработки биоудобрений.

Цель работы — изучить влияние компонентов питательной среды на солюбилизацию трикальцийфосфата штаммом *Pantoea brenneri* 3.5.2.

Количество свободных фосфатов, высвобожденных штаммом *P. brenneri* 3.5.2, измеряли на среде NBRIP с  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Эксперименты проводили в стерильных колбах при 30 °С и 200 об/мин в течение 3 суток. Изменяли источники углерода и азота в составе среды. В качестве источников углерода применяли глюкозу, маннитол, сахарозу, галактозу, мальтозу, ксилозу и фруктозу, в качестве источников азота — сульфат аммония, нитрат калия, дрожжевой экстракт, пептон и мочевины.

При изменении источников углерода в составе среды наибольшее количество свободных фосфатов обнаружено при использовании глюкозы — 1168,03 мг/л. При этих условиях также наблюдалась наибольшая эффективность солюбилизации (74,56 %) и происходило максимальное подкисление pH среды: снижение с 7,0 до 2,9.

При изменении источников азота выявлено, что наибольшее количество фосфатов выделялось на среде с дрожжевым экстрактом — 1219,95 мг/л, однако большое количество свободных фосфатов находилось и в контрольной колбе (867,7 мг/л), при этом эффективность солюбилизации фосфора составила 40,7 %, что не является максимальным показателем. Дрожжевой экстракт содержит фосфаты [3], которые увеличивают фоновое значение свободного фосфора в пробе. Поэтому дрожжевой экстракт не может быть рассмотрен в качестве наилучшего источника азота для повышения солюбилизации фосфатов штаммом *P. brenneri* 3.5.2. При использовании сульфата аммония в качестве источника азота количество свободных фосфатов составило 1168,03 мг/л, при этом эффективность солюбилизации фосфора была 74,56, а также происходило максимальное подкисление pH среды (с 7,0 до 2,94). Таким образом, сульфат аммония явился наилучшим источником азота для солюбилизации трикальцийфосфата штаммом *P. brenneri* 3.5.2.

### Литература

1. Chen Q., Liu S. Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea sp.* S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 1–12.
2. Mei C., Chretien R. L., Amaradasa B. S. et al. Lowman Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion *In vitro* and in Greenhouse // *Microorganisms.* 2021. Vol. 9 (9). P. 1–11.
3. Thompson K. A., Summers R. S., Cook S. M. Development and experimental validation of the composition and treatability of a new synthetic bathroom greywater (SynGrey) // *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2017. Vol. 6. P. 1120–1131.

\* Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансирована грантом Российского научного фонда (№ 21-76-00017).

© Л. В. Сокольникова, Д. С. Бульмакова, А. Д. Сулейманова, 2022



## КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА ПУТЕМ ОВЕРЭКСПРЕССИИ И МНОГОКОПИЙНОЙ ХРОМОСОМНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ОПЕРОНА *trpLEDCBA*

А. А. Степанова, Д. М. Бубнов, Т. В. Выборная, А. А. Хозов, М. Д. Кудина, С. П. Синеокий

Биоресурсный центр — всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Курчатовского комплекса генетических исследований (ГосНИИгенетика) НИЦ «Курчатовский институт», Москва

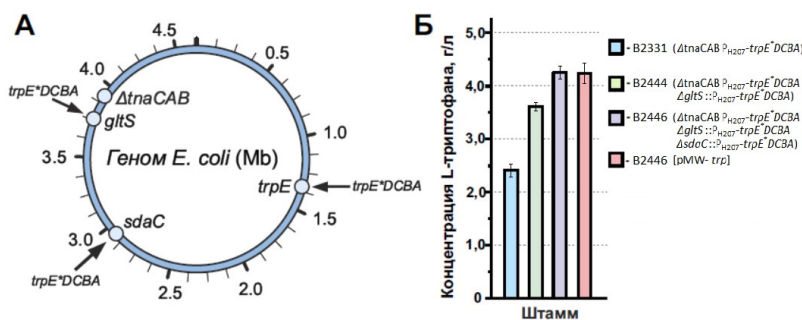
✉ ryzh18@mail.ru

### Аннотация

В данном исследовании показано, как повышение количества копий оперона  $P_{H207}$ -*trpE*<sup>S40F</sup>*DCBA* в продуценте влияет на продукции L-триптофана. При интеграции двух дополнительных копий в хромосому штамма-продуцента продукция увеличилась почти в 2 раза по сравнению со штаммом, имеющим одну копию оперона.

Создание продуцента триптофана на основе *Escherichia coli* подразумевает комплексную модификацию клеточного метаболизма. В частности, требуется инактивировать путь деградации триптофана, ослабить его транспорт в клетку, активировать реакцию ДАНР-синтазы, а также повысить доступность фосфоенолпирувата, серина и глутамина, выступающих в качестве интермедиатов биосинтетического пути. Ключевая мишень при конструировании продуцента — ферменты-продукты генов оперона *trpLEDCBA*, которые катализируют реакции синтеза триптофана из хоризмата. Модификации оперона *trpLEDCBA* включают введение точечных замен в *trpE*, снимающих ретроингибирование антранилатсинтазы триптофаном, а также повышение уровня экспрессии всех генов оперона, что достигается путем удаления аттенюатора *trpL*, инактивации репрессора TrpR, амплификацией оперона на многокопийной плазмиде или заменой нативного промотора на сильный и конститутивный [1].

В ходе нашей работы создан штамм, в котором были делетированы гены *tnaA* и *tnaB*, кодирующие триптофаназу и основной транспортер триптофана соответственно. В последовательность гена *trpE* внесена десенсибилизирующая мутация S40F [2], удален аттенюатор *trpL* и заменен нативный промотор на  $P_{H207}$  из бактериофага T5, один из сильнейших  $\sigma 70$ -зависимых промоторов в *E. coli* [3]. Полученный штамм накапливал ~ 2,5 г/л триптофана за 30 ч культивирования. Консенсусное мнение, представленное в научной литературе, состоит в том, что оверэкспрессии *trpEDCBA* под контролем промоторов средней силы, таких как  $P_{trc}$  или  $P_{tac}$ , достаточно для достижения насыщающей активности соответствующих ферментов и дальнейшее увеличение продуктивности культуры достигается за счет модификации других мишеней [4, 5]. Поэтому в полученном штамме проанализированы другие потенциальные узкие места в пути биосинтеза. В частности, оверэкспрессирована аллель *aroG*<sup>D146N</sup> [2], кодирующей ДАНР-синтазу, не чувствительную к ингибированию фенилаланином, а также протестировали эффект внесения в среду серина и глутамин. Ничто из этого не позволило добиться повышения накопления триптофана. На основе полученных результатов сделан вывод о том, что одна из реакций превращения хоризмата в триптофан по-прежнему лимитирует его биосинтез. Так как нами был уже использован один из сильнейших промоторов, дальнейшее повышение уровня экспрессии оперона *trpE*<sup>S40F</sup>*DCBA* путем модификации промотора не представлялось возможным. Поэтому была интегрирована вторая копия оперона  $P_{H207}$ -*trpE*<sup>S40F</sup>*DCBA* в локус *gltS*. Полученный штамм накапливал на 46 % больше продукта по сравнению с родительским. Интеграция третьей копии оперона в локус *sdaC* позволила поднять продукцию на 18 % (см. рисунок). Дополнительная ампли-



А — геном *E. coli* с указанием местоположения внесенных модификаций в продуцент; Б — накопление триптофана в культуральной жидкости штаммов с разным количеством копий  $P_{H207}$ -*trpE*<sup>S40F</sup>*DCBA*

фикация конструкции  $P_{H207}\text{-trpE}^{S40F}DCBA$  на малокопийной плазмиде рMW-trp не привела к увеличению продуктивности, это свидетельствует о том, что три копии  $P_{H207}\text{-trpE}^{S40F}DCBA$  обеспечивают насыщающий уровень активности соответствующих ферментов и дальнейшее повышение продуктивности может быть достигнуто путем устранения других потенциальных узких мест.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что способность клеток *E. coli* синтезировать триптофан в наибольшей степени определяется активностью реакций, соответствующих терминальному отрезку биосинтетического пути от хоризмата до триптофана. При этом насыщающий уровень активности ферментов, соответствующих оперону *trpEDCBA*, недостижим за счет замены нативного промотора на сильный гетерологичный. Показано, что данная задача может быть успешно решена путем многокопийной интеграции идентичных копий оперона в бактериальную хромосому.

### Литература

1. Паничкин В. Б. и др. Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции L-триптофана // Биотехнология. 2016. Т. 32, № 2. С. 11–42.
2. Liu L. et al. Metabolic engineering and fermentation process strategies for L-tryptophan production by *Escherichia coli* // Processes. 2019. Т. 7, № 4. С. 213.
3. Deuschle U. et al. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of *in vivo* strength indicates alternate structures // EMBO J. 1986. Т. 5, № 11. С. 2987–2994.
4. Gu P. et al. One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of L-tryptophan in *Escherichia coli* // Microb. Cell Factories. 2012. Т. 11, № 1. С. 1–9.
5. Chen L., Zeng A.P. Rational design and metabolic analysis of *Escherichia coli* for effective production of L-tryptophan at high concentration // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. Т. 101, № 2. С. 559–568.

## ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

С. А. Степанова

*Волгоградский государственный университет*

✉ stepanovaca@mail.ru

### Аннотация

В настоящее время возник спрос на БАД, обладающие противовоспалительным действием. В период обострения ОРВИ и простудных заболеваний они являются дополнительным источником витаминов и полезных веществ. Помимо этого, они могут облегчить протекание болезни и убрать некоторые симптомы, сопровождающие ее развитие.

Воспаление — это последовательное выделение циклооксигеназы, которая участвует в синтезе простагландинов. Физиологическое действие нестероидных противовоспалительных средств (НВПС) заключается в том, что они блокируют выработку ЦОГ, тем самым не дают простагландинам синтезироваться и вызвать реакции воспаления.

Любой нестероидный противовоспалительный препарат может быть потенциально токсичен, особенно при хронических заболеваниях печени, почек и сердечно-сосудистой системы. Чтобы снизить риск возникновения побочных эффектов от применения НВПС, можно использовать травы и их отвары для профилактики и лечения. В Волгоградской области произрастает большое количество трав, обладающих необходимыми свойствами. В состав сбора может входить малина, зверобой, липа, чабрец, душица, шалфей и девясил.

В зверобое содержатся гиперидин, псевдогиперидин, гиперозид, рутин, кверцитрин, изокверцитрин, катехины, лейкоантоцианиды, дубильные вещества, эфирные масла, каротиноиды, небольшие количества кислоты аскорбиновой. Он обладает противовоспалительным свойством, антимикробной активностью к микроорганизмам, устойчивым к действию антибиотиков.

Цветки липы имеют в своем составе эфирное масло, гликозиды гесперидин и тилиацин, сапонины, дубильные вещества, каротин, аскорбиновую кислоту. Обладают противовоспалительным, жаропонижающим действием.

В траве чабреца содержится эфирное масло с преобладанием фенолов: тимол и карвакрол. Также присутствуют кислоты олеаноловая и урсоловая, флавоноиды.

В листьях малины есть аскорбиновая кислота, органические кислоты, дубильные вещества, флавоноиды. Благодаря этому они обладают противовоспалительным и жаропонижающими свойствами.

Корневища и корни девясила содержат инулин, полисахариды, смолы, камедь, сапонины, эфирное масло, главной составной частью которого являются бициклические сесквитерпены: алантолактон, изоалантолактон и дигидроалантолактон. Кроме геленина, в составе эфирного масла девясила есть алантол, проазулен, токоферол.

Душица содержит дубильные вещества, эфирное масло и аскорбиновую кислоту. Компоненты масла: тимол, карвакрол, би- и трициклические сесквитерпены, геранилацетат. Эфирные масла с высоким содержанием карвакрола превосходят по своим бактерицидным свойствам многие антибиотики.

Во всех части шалфея есть эфирное масло, которое состоит из D- $\alpha$ -пинена, цинеола,  $\alpha$ - и  $\beta$ -туйона, D-борнеола и D-камфоры. В листьях обнаружены также алкалоиды, флавоноиды, дубильные вещества, олеаноловая и урсоловая кислоты. Обладает дезинфицирующим, противовоспалительным свойством, уменьшает потоотделение.

Подобные сборы могут использоваться в качестве профилактики в сезон высокой заболеваемости ОРВИ, а также служить дополнительным источником витаминов. Так как такие БАД не содержат высокой концентрации активных веществ по сравнению с лекарственными средствами, то их применение не будет оказывать ярко выраженного негативного воздействия на органы желудочно-кишечной тракта.

### Литература

1. National Library of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. Валиева Н. Г. Лекарственные растения — источники биологически активных веществ // Учен. зап. Казан. гос. акад. ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2010. Т. 203. С. 44–48.
3. Филиппова И. Рынок растительных средств: проблемы, перспективы, приоритеты // Ремедиум. 2016. Т. 7–9. С. 15–16.
4. Майский В. В., Муратов В. К. Фармакология с рецептурой. М.: Медицина, 1986. С. 448.
5. Соколов С. Я. Фитотерапия и фитофармакология. М.: Мед. информ. агенство, 2000. 976 с.

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МОРФОЛОГИЮ И СОСТАВ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ\*

В. В. Суворова

Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии,  
Научно-исследовательский центр «БиоХимТех», Тульский государственный университет

✉ suvorova.victoria.2010@mail.ru

### Аннотация

В ходе проведенных экспериментов показано, что актинобактерии рода *Rhodococcus* способны расти на труднодоступном субстрате в разном температурном режиме за счет синтеза жирных кислот — одного из адаптационных механизмов бактерий к экстремальным условиям окружающей среды. При этом доля ненасыщенных жирных кислот была повышена. При понижении температуры до 10 °С морфология клеток изменялась с формы «кокк» и короткой палочковидной на длинную палочку.

Бактерии рода *Rhodococcus* принадлежат к типу *Actinobacteria* и являются генетически и физиологически разнообразными. Они распространены в различных водных, почвенных и морских средах обитания, включая суровые экологические условия окружающей среды, такие как Арктика, пустыня и сильно загрязненные участки [1, 2]. Широкое распространение штаммов *Rhodococcus* spp. обусловлено их метаболической универсальностью и устойчивостью в окружающей среде [3], благодаря чему играют важную роль в биоремедиации, биотрансформации и биокатализе, активно используются для производства соединений, имеющих экологическое, промышленное и медицинское значение [4]. Различные виды этого рода обладают способностью к биосинтезу липидов в виде полигидроксиалканоев, триацилглицеринов (TAGs) или эфиров воска [5]. Ввиду разнообразия областей применения бактерий рода *Rhodococcus* необходимо понимать закономерности влияния условий среды на микроорганизмы.

Цель работы — оценка влияния пониженной температуры на жирнокислотный состав и морфологию бактерий-деструкторов углеводородов нефти.

Для исследования были выбраны 2 штамма бактерий: *Rhodococcus erythropolis* X5 и *Rhodococcus erythropolis* S67, входящие в состав биопрепарата «МикроБак» [6]. В работе использовали минеральную среду Эванса, а в качестве единственного источника углерода вносили *n*-гексадекан (2 % по объему). Культивирование проводили при 26 и 10 °С в течение 3 и 12 суток соответственно. Состав общих липидов определяли методом газовой хроматографии на приборе Хроматэк «Кристалл-5000» с пламенно-ионизационным детектором, анализируя соответствующие метиловые эфиры жирных кислот.

Для обоих штаммов проанализирован жирнокислотный состав при понижении температуры до 10 °С (рис. 1). Можно сделать вывод, что адаптация родококков в таких условиях происходит благодаря повышению степени ненасыщенности жирных кислот, т. е. введению двойной связи в структуру жирных кислот специфической десатуразой, а также увеличению метильного и гидроксильного разветвления.

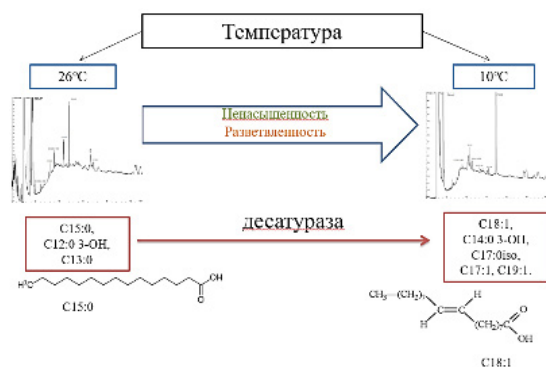


Рис. 1. Адаптационные особенности жирнокислотного состава бактерий *R. Erythropolis*

При культивировании бактерий на *n*-гексадекане происходит синтез жирных кислот, которые, в свою очередь, вступают в различные пути метаболизма: β-окисление, удлинение цепи жирных кислот и путь Кеннеди. Так, в работе [7] исследована зависимость метаболизма жирных кислот от длины цепи источника углерода. При длине цепи субстрата больше 12 метаболизм протекает по пути Кеннеди, следовательно, пальмитиновая или олеиновая кислоты могут не образоваться. Таким образом, на синтез триацилглицеринов могут влиять источники углерода, содержащиеся в питательной среде.

В результате окрашивания бактерий флуоресцентным красителем Nile Red доказано содержание нейтральных липидов в клетках родококков при культивировании на *n*-гексадекане. Nile Red — это липофильный

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности проект № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

флуоресцентный краситель, который, избирательно связываясь с TAG, дает желто-оранжевое флуоресцентное свечение (рис. 2).

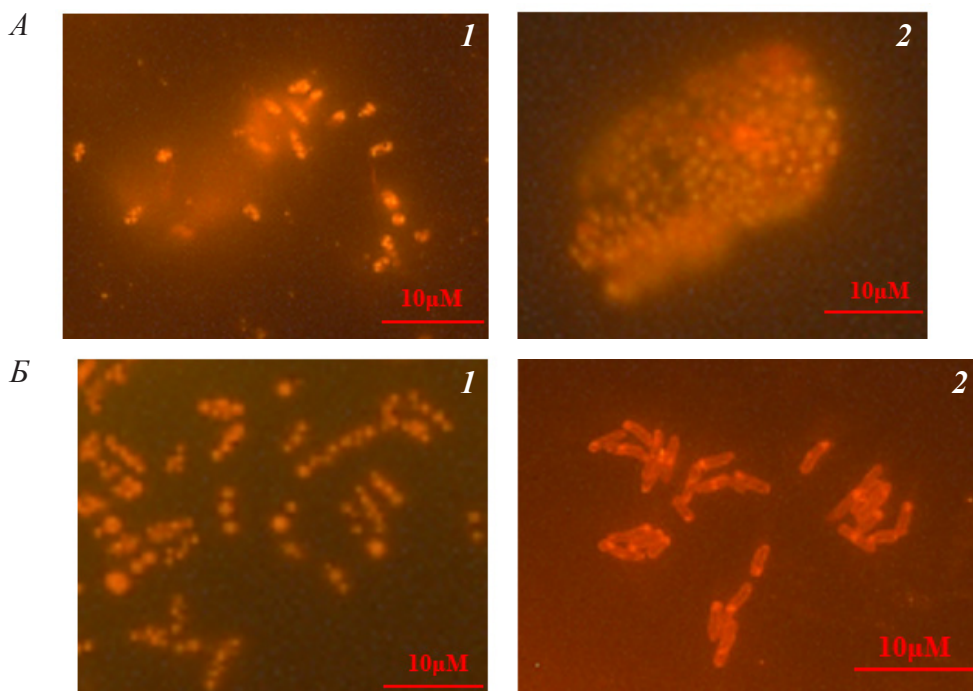


Рис. 2. Визуализация липидов с помощью флуоресцентной микроскопии: А — *R. erythropolis* X5 (1), *R. erythropolis* S67 (2) при 26 °С; Б — *R. erythropolis* X5 (1), *R. erythropolis* S67 (2) при 10 °С

Этот метод позволил также оценить воздействие температурного стресса на морфологические особенности данных бактерий. Так, *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 форму «кокк», или короткую палочковидную форму при 26 °С, изменили на длинную стержневую морфологию клеток при 10 °С. Полученные данные согласуются с результатами других авторов [8], которые изучали морфологию клеток и состав жирных кислот родококков при температурах 10–30 °С.

Таким образом, наблюдаемые изменения жирнокислотного состава и морфологии исследуемых штаммов родококков служили адаптационными реакциями на понижение температуры культивирования.

### Литература

1. Cappelletti M., Zampolli J., Gennaro P. D. et al. Genomics of *Rhodococcus* // Biol. *Rhodococcus*. Springer, Cham, 2019. P. 23–60.
2. Cappelletti M., Fedi S., Zannoni D. Degradation of alkanes in *Rhodococcus* // Biol. *Rhodococcus*. Springer, Cham, 2019. P. 137–171.
3. Cappelletti M., Fedi S., Zampolli J. et al. Phenotype microarray analysis may unravel genetic determinants of the stress response by *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 and *Rhodococcus opacus* R7 // Res. Microbiol. 2016. Vol. 167, № 9–10. P. 766–773.
4. Cappelletti M., Presentato A., Piacenza E. et al. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. Vol. 104, № 20. P. 8567–8594.
5. Alvarez H. M., Steinbüchel A. Biology of triacylglycerol accumulation by *Rhodococcus* // Biol. *Rhodococcus*. Springer, Cham, 2019. P. 299–332.
6. Ветрова А. А., Иванова А. А., Фионов А. Е. и др. Сравнительная эффективность деградации нефтепродуктов консорциумом плазмидосодержащих штаммов-деструкторов и биопрепаратами «МикроБак», «Биоойл» // Изв. Тул. Гос. ун-та. Естеств. науки. 2013. № 2-1. С. 258–272.
7. Zhang L. S., Chu M. Y., Zong M. H. et al. Carbon source modify lipids composition of *Rhodococcus opacus* intended for infant formula // J. Biotechnol. 2020. Vol. 319. P. 8–14.
8. Wang C., Chen Y., Zhou H. et al. Adaptation mechanisms of *Rhodococcus* sp. CNS16 under different temperature gradients: Physiological and transcriptome // Chemosphere. 2020. Vol. 238. P. 124571.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНЫХ ШТАММОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ОТ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 168\*

Г. Э. Султанов, Ю. В. Данилова

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

✉ Danilova146@mail.ru

### Аннотация

Спорообразующие грамположительные бактерии рода *Bacillus* относятся к одной из самых разнообразных и широко представленных групп микроорганизмов в природе. Природная способность этой группы бактерий синтезировать и секретировать ряд важных метаболитов промышленного, сельскохозяйственного и медицинского значения делает бациллы важным объектом промышленной биотехнологии. В связи с быстрым развитием постгеномных исследований в настоящее время используются эффективные генетические инструменты для целенаправленной модификации геномов *Bacillus*. В связи с этим изучение и тестирование штаммов с редуцированными геномами для продукции гетерологичных белков является актуальной задачей биотехнологии.

В настоящей работе изучены штаммы *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами: 27-42 и 27-31, в геноме которых инактивированы гены спорообразования, антимикробных метаболитов, образования биопленок и внеклеточных протеиназ, а также встроена кассета *comK/comS* для повышения эффективности трансформации. В качестве контрольного штамма использовали *B. subtilis* 168. Предполагалось, что штаммы *B. subtilis* с редуцированными геномами обладают меньшей протеолитической активностью по сравнению с контрольным штаммом *B. subtilis* 168, а также являются полезными для применения в качестве продуцентов рекомбинантных белков свойствами.

Изучена динамика роста и накопления протеолитической и фосфатазной активностей штамма *B. subtilis* 168 и производных от него мутантных штаммов.

По результатам экспериментов показано, что штаммы с редуцированным геномом достигли более высокой оптической плотности (OD<sub>600</sub>), чем родительский штамм в логарифмической и стационарной стадии роста культуры. Установлено, что штамм *B. subtilis* 168 достигает максимальной оптической плотности к 18 ч роста культуры. Штаммы *B. subtilis* с редуцированными геномами 27-31 и 27-42 достигают максимальной оптической плотности к 22–24 ч роста культуры соответственно.

Протеолитическая активность исследуемых редуцированных штаммов 27-42 и 27-31 ниже, чем контрольного 168. Максимальная протеолитическая активность *B. subtilis* 168 наблюдалась на 57-й ч роста культуры и составила 0,81 ед/мл. В штамме *B. subtilis* 27-31 протеолитическая активность была в среднем 0,063 ед/мл в процессе роста культуры. Максимальная активность зафиксирована в фазе отмирания культуры на 72-й ч: 0,334 ед/мл. В редуцированном штамме *B. subtilis* 27-42 протеолитическая активность практически отсутствовала. Максимальная активность наблюдалась на 48-й ч и составила 0,496 ед/мл.

Согласно полученным данным, фосфатазная активность варьирует у различных штаммов: у нативного штамма выше, чем у производных от него штаммов, и сохраняется на протяжении стационарной фазы, достигая максимума в фазе отмирания. Вероятнее всего, это связано с процессом спорообразования у культуры. У штаммов с редуцированными геномами уровень фосфатазной активности значительно снижается, достигая максимального значения у штамма 27-31 в середине стационарной фазы — на 42-й ч. У штамма 27-42 максимальное значение фосфатазной активности наблюдалось на 24-й ч, что совпадает с максимумом его оптической плотности. Данные результаты могут быть связаны с разносторонним вкладом фосфатаз в регуляторную сеть у штаммов с разными наборами генов и станут основой для использования штаммов с редуцированными геномами в качестве клеток-реципиентов для получения рекомбинантных белков.

\* This work was part of Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030) and funded by grant from the Russian Science Foundation [project № 22-16-00138].

## СИСТЕМА АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА НА ОСНОВЕ ФУКОИДАНА\*

В. Е. Супрунчук

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь

✉ vsuprunchuk@ncfu.ru

### Аннотация

Биодеградируемые наноконпозиты, обладающие способностью к магнитному наведению, являются новым классом функциональных материалов, позволяющих расширить возможностей клинической терапии. С помощью применения в подобных системах полисахаридов как альтернативы синтетическим полимерам можно получить ряд полезных эффектов, в том числе снижение токсичности.

Разработка таргетных систем доставки в качестве фармацевтических композиций с высокой селективностью действия и сниженными побочными эффектами иммобилизованных терапевтических агентов — актуальная проблема. Существуют различные подходы к формированию подобных систем, среди них можно выделить органо-неорганические наноконпозитные материалы, которые благодаря сочетанию компонентов различной природы и нанометровой размерности могут обладать улучшенными конечными характеристиками.

В качестве основы таких систем в работе использован фукоидан. Это полисахарид, выделяемый из бурых водорослей с широким спектром биологической активности, что делает его перспективным материалом для разработки новых материалов медицинского назначения. Кроме того, фукоидан способен связываться с Р-селектином [1] в большом количестве, локализуемом в тромбе [2, 3], что позволяет применять его для борьбы с тромботическими явлениями. Таким образом, фукоидан может выступать как тромб-направленный вектор при конъюгации с лекарственными веществами.

Для создания системы адресной доставки фибринолитического фермента взят фукоидан, выделенный из бурой водоросли *Fucus vesiculosus* и обработанный ультразвуком 20 кГц. Биоконпозитные наночастицы фукоидан/магнетит готовили путем смешивания раствора фукоидана и золя магнетита. В качестве фибринолитического фермента использован тканевой активатор плазминогена, иммобилизация которого осуществлялась двумя подходами: путем электростатического взаимодействия и с помощью сшивающего агента.

В ходе работы установлено, что в результате взаимодействия фукоидан/магнетит размер полученных частиц составил  $148,6 \pm 22$  нм с электрохимическим потенциалом поверхности  $+10,74 \pm 0,64$  мВ. После загрузки фермента размер частиц возрастал: при электростатическом взаимодействии — до 264 нм, при использовании сшивающего агента — до 370 нм. Количество загруженного фермента определяли методом Бредфорда. Включение фермента при электростатическом взаимодействии составило  $9,95 \pm 0,05$  масс. %, а с помощью сшивающего агента —  $2,06 \pm 0,09$  масс. % При исследовании релиза выявлено наличие Берст-эффекта.

Применение математического моделирования показало, что лучшей моделью для описания процесса выпуска фибринолитического фермента из матрицы при электростатическом взаимодействии является кинетическое уравнение Корсмейер — Пеппаса, где на процесс релиза ферментного препарата оказывает влияние диффузия, подчиняющаяся закону Фика.

### Литература

1. Bachelet L., Bertholon I., Lavigne D. et al. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets // *Biochim. Biophys. Acta. General Subjects*. 2009. Vol. 1790 (2). P. 141–146.
2. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease // *Trends Mol. Med*. 2003. Vol. 9 (6). P. 263–268.
3. Juenet M., Aid-Launais R., Li B. et al. Thrombolytic therapy based on fucoidan-functionalized polymer nanoparticles targeting P-selectin // *Biomater*. 2018. Vol. 156. P. 204–216.

\* Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам (№ СП 1758.2021.4).

## ОБЪЕДИНЕНИЕ СТАДИЙ СБОРА БИОМАССЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS* И ОЧИСТКИ ЭКСТРАКТА С-ФИКОЦИАНИНА ПРИ ПОМОЩИ ХИТОЗАНОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Д. В. Сухинов<sup>1</sup>, П. М. Готовцев<sup>1,2</sup>, Я. Э. Сергеева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ sukhinov.dv@yandex.ru

### Аннотация

В данной работе показана возможность сбора биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* флокуляцией хитозанами с различной молекулярной массой, вязкостью и степенью деацетилирования. С-фикоцианин, выделенный из сфлуктурированной биомассы, обладал большей чистотой и антиоксидантной активностью по сравнению с контролем. Динамика процесса флокуляции и параметры С-фикоцианина зависели от характеристик хитозана.

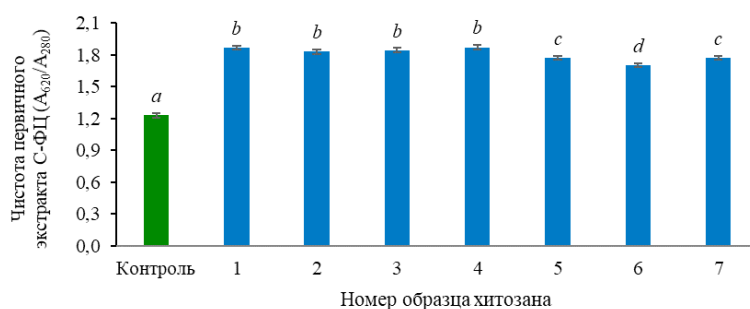
Для масштабного культивирования фототрофных микроорганизмов необходимо разработать эффективный и дешевый метод сбора биомассы [1]. Перспективной технологией считается флокуляция [1, 2]. При этом наиболее подходящим вариантом флокулянта для пищевой и косметической промышленности является хитозан — нетоксичный, биоразлагаемый, биосовместимый катионный полисахарид [2].

Одним из перспективных направлений применения хитозана представляется очистка С-фикоцианина (С-ФЦ) — ценного внутриклеточного соединения, содержащегося, например, в биомассе цианобактерии *Arthrospira platensis*. Ценность С-ФЦ определяется его противовоспалительными и иммуностимулирующими свойствами, гепато- и нейропротекторным действием, терапевтический эффект обусловлен высокой антиоксидантной активностью [3]. С-ФЦ широко используется в пищевой, косметической промышленности, а также в медицинской диагностике, терапии и лабораторных исследованиях [4]. При этом, в зависимости от области применения С-ФЦ, существуют разные требования к его чистоте (определяется по спектру поглощения из отношения A620/A280).

Установлено, что независимо от характеристик хитозанов (см. таблицу) эффективность флокуляции превышала 90 % спустя 60 мин с момента добавления флокулянта. Однако тип хитозана влиял на динамику процесса. Отмечено повышение чистоты первичных экстрактов С-ФЦ, полученных из сфлуктурированной биомассы, на 38–52 % по сравнению с контролем (см. рисунок), при этом антиоксидантная активность также была выше контрольной величины.

### Характеристики исследуемых хитозанов

№ п/п	Название и каталожный номер	Мw, кг/моль	Вязкость, сП (1%-й р-р в 1%-й уксусной к-те)	Степень деацетилирования, %
1	43000 (Primex ChitoClear)	26	< 20	69–78
2	42020 (Primex ChitoClear)	149	200–600	56–64
3	43020 (Primex ChitoClear)	313	200–600	62–68
4	42040 (Primex ChitoClear)	594	1200–2000	59
5	43040 (Primex ChitoClear)	253	1200–2000	60–66
6	Биопрогресс	492	–	61
7	448877 (Sigma-Aldrich)	130	200–800	74–85



Влияние типа хитозана (1–7) на чистоту С-ФЦ, полученного из сфлуктурированной биомассы



Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что сбор биомассы цианобактерии *A. platensis* с применением хитозана в качестве флокулянта значительно сокращает время сбора, повышает антиоксидантную активность и чистоту первичных экстрактов С-фикоцианина, что позволяет использовать его в пищевой и косметической промышленности, минуя дополнительную стадию очистки.

#### **Литература**

1. Laamanen C. A., Desjardins S. M., Senhorinho G. N. A., Scott J.A. Harvesting microalgae for health beneficial dietary supplements // *Algal Res.* 2021. Vol. 54. P. 102189.
2. Li S., Hu T., Xu Y. et al. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives // *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2020. Vol. 131. P. 110005.
3. Furmaniak M. A., Misztak A. E., Franczuk M. D. et al. Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8(DEC).
4. Seyedi S., Parvin P., Jafargholi A. et al. Fluorescence properties of Phycocyanin and Phycocyanin-human serum albumin complex // *Spectrochim. Acta, Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy.* 2020. Vol. 239. P. 118468.

## ЗАГРЯЗНЕНИЕ АМФИПОД ОЗЕРА БАЙКАЛ АКТИВНЫМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ СУБСТАНЦИЯМИ\*

Т. Ю. Тельнова, М. М. Моргунова, С. С. Шашкина, А. А. Власова,  
В. Н. Шелковникова, Е. А. Мишарина, Д. В. Аксенов-Грибанов

*Иркутский государственный университет*

✉ [telnovatamara1410@gmail.com](mailto:telnovatamara1410@gmail.com)

### Аннотация

В ходе проведенных экспериментов показано, что амфиподы озера Байкал способны накапливать в себе активные фармацевтические препараты, что может негативно сказываться как на самой экосистеме, так и на ее обитателях при миграции загрязнителей по трофическим цепям.

Загрязнение водоемов различными токсикантами и лекарственными препаратами — одна из значимых и актуальных проблем. Именно лекарственные препараты могут оказывать непредсказуемые и негативные эффекты на водные экосистемы и их обитателей. Известно, что накопление организмами лекарственных препаратов может приводить как к нарушению пищевых цепей, так и к непосредственной гибели отдельных особей.

Особую значимость приобретают исследования по анализу содержания лекарственных препаратов в эндемичных обитателях древних экосистем, одной из которых, отличающихся своей структурной и экологической сложностью, выступает экосистема озера Байкал и ее обитатели. Ранее для экосистемы озера Байкал проведены лишь единичные исследования, направленные на оценку содержания лекарственных препаратов в водах озера, тогда как в научной литературе отсутствуют упоминания об изучении содержания лекарственных препаратов в образцах беспозвоночных организмов. Цель данного исследования — выявление лекарственных препаратов в амфиподах озера Байкал с помощью подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС).

Оценку контаминации экосистемы лекарственными препаратами проводили на примере эндемичных амфипод родов *Eulimnogammarus*, *Brandtia* и *Pallasea*, собранных в районе пос. Большое Голоустное, пос. Листвянка и р. Ангара в черте Иркутска. Для качественного анализа и определения параметров ионизации молекул применяли 33 лекарственных препарата, таких как ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, амикацин, окситетрациклин и др. Исследования выполнены на базе хромато-масс-спектрометрического комплекса Agilent Infinity II с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470B(QQQ).

Таким образом, показан факт наличия лекарственных препаратов в обитателях озера Байкал в следовых количествах. Установлено, что от 63 до 100 % амфипод различных популяций загрязнены лекарственными препаратами синтетического происхождения. Это может негативно сказываться как на самой экосистеме, так и на ее обитателях при миграции загрязнителей по трофическим цепям.

---

\* Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно-образовательных центрах (проект № 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал), Гранта Президента РФ (МК-1245.2021.1.4), а также по программе поддержки молодых ученых Иркутского государственного университета.

© Т. Ю. Тельнова, М. М. Моргунова, С. С. Шашкина, А. А. Власова, В. Н. Шелковникова, Е. А. Мишарина, Д. В. Аксенов-Грибанов, 2022

## РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ МЕТОДИКИ МАССОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ КАРЛИКОВОГО КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ВСЛ-2 В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Т. В. Терещенко, Е. Л. Гричик

Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций  
и защитного лесоразведения РАН, Волгоград

✉ tereschenko@vfanc.ru

### Аннотация

Представлены аспекты по введению, размножению и укоренению клонового подвоя ВСЛ-2 для косточковых в условиях *in vitro* для массового производства.

ВСЛ-2 — засухоустойчивый, морозостойкий, слаборослый, карликовый подвой для сортов косточковых культур, который снижает их силу роста и обеспечивает высокую продуктивность. Методы микрклонального размножения растений дают возможность их оздоровления, повышения коэффициента размножения и получения посадочного материала независимо от времени года.

Цель исследования — оценить влияние регуляторов роста «Эпин-экстра» (24-эпибрассинолид) и 6-бензиламинопурина на пролиферацию побегов подвоя ВСЛ-2 в культуре *in vitro*, а также индолил-3-масляной кислоты на процесс ризогенеза. Работа выполнялась на базе лаборатории биотехнологий ФНЦ агроэкологии РАН.

В качестве эксплантов использовали зеленые микрочеренки размером 1,5–2 см с 1–2 междоузлиями, взятые со взрослого маточного дерева подвоя ВСЛ-2. Культивирование растений в условиях *in vitro* начинается с этапа введения растительных эксплантов в культуру *in vitro*, который включает подбор режима стерилизации. Экспланты стерилизовали по следующей схеме: мыльный раствор (10 мин) → проточная вода (1 ч) → 70%-й этиловый спирт (1 мин) → 10%-й раствор «Белизны» (5 мин) → стерильная дистиллированная вода → 5%-й раствор «Лизоформина-3000» (3 мин) → 5-кратное промывание в стерильной дистиллированной воде. Обработанные экспланты сажали в пробирки с питательной средой по прописи MS. Данный способ стерилизации позволил получить до 60 % стерильных жизнеспособных эксплантов.

На этапе микроразмножения побеги растений-регенерантов пересаживали на питательные среды с содержанием разных концентраций 0,2–2,0 мг/л регуляторов роста «Эпин-экстра» и 0,5 мг/л 6-БАП для их пролиферации и дальнейшего размножения. За основу взята питательная среда по прописи MS. Все манипуляции проводили в стерильных условиях ламинар-бокса.

Использование «Эпин-экстра» в составе питательной среды в концентрации 2,0 мг/л дает возможность получения коэффициента размножения  $6,5 \pm 1,3$  (рис. 1). При сочетании «Эпин-экстра» (0,2–2,0 мг/л) с 6-БАП (0,5 мг/л) отмечалось образование конгломерата побегов, нарушение их нормальной морфологии и витрификация (рис. 2). Применение 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л не дало положительного эффекта: происходило утолщение побега, уменьшение размера листовой пластины, роста практически не наблюдалось (рис. 3).



Рис. 1. Побеги на безгормональной среде MS (слева), с «Эпин-экстра» 0,5 мл/л (справа) через 5 недель культивирования



Рис. 2. Конгломераты побегов на средах с «Эпин-экстра» в сочетании с 6-БАП через 5 недель культивирования

На этапе укоренения использовали индолил-3-масляную кислоту (ИМК) в составе питательной среды MS в концентрациях 0,1–1,0 мг/л. Побеги 100 % укоренялись на среде с ИМК 0,2 мг/л (рис. 4). На более высоких концентрациях ИМК (0,5–1,0 мг/л) отмечали витрификацию и удлинение побегов до  $10,5 \pm 1$  см, а также спонтанное укоренение на безгормональной среде MS.

В результате исследования проведен предварительный этап разработки методики массового производства карликового подвоя ВСЛ-2 (рис. 5). Подобраны среды с использованием препарата «Эпин-экстра» в качестве стероидного гормона 24-эпибрассинолида, который повысил коэффициент размножения.



Рис. 3. Побеги на среде MS с добавлением 6-БАП 0,5 мг/л через 5 недель культивирования



Рис. 4. Укорененные побеги подвоя ВСЛ-2 на среде MS с ИМК-0,2 мг/л через 5 недель культивирования



Рис. 5. Культивирование подвоев ВСЛ-2 на фитостеллаже «СТЕЛЛАР-ФИТО LINE»

В дальнейшем планируется продолжить работы по подбору сред для увеличения коэффициента размножения микропобегов подвоя ВСЛ-2, а также условий адаптации укорененных пробирочных растений к нестерильным условиям произрастания.

## РАЗРАБОТКА ШТАММА *KOMAGATAELLA PHAFFII* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМАРКЕРНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ\*

А. А. Ткаченко, С. П. Синеокий, Т. Л. Гордеева

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

✉ artur.tka4enko10@gmail.com

### Аннотация

С помощью системы CRISPR/Cas9 получен штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-5013, ауксотрофный по гистидину. Оценена эффективность инактивации гена *HIS4* с использованием различных вариантов гидРНК. На основе данного штамма сконструирован безмаркерный штамм-продуцент фитазы *Citrobacter gillenii* с продуктивностью, более чем в два раза превышающей продуктивность контрольного штамма, полученного на основе коммерческого штамма *K. phaffii* GS115.

Применение в биотехнологическом производстве безмаркерных штаммов-продуцентов гетерологичных белков актуально и практически значимо, поскольку существуют ограничения на использование антибиотиков в качестве селективных агентов с целью предотвращения их возможного нежелательного распространения среди микроорганизмов окружающей среды.

Метилотрофные дрожжи *K. phaffii* — одна из наиболее распространенных эукариотических систем экспрессии для производства гетерологичных белков.

В настоящее время коммерческие ауксотрофные штаммы-реципиенты, такие как *K. phaffii* GS115, получены путем неспецифического мутагенеза, что может негативно сказываться на физиологических и ростовых характеристиках сконструированных на их основе штаммов-продуцентов гетерологичных белков.

Цель исследования — разработка штамма-реципиента с высоким экспрессионным потенциалом с помощью высокоспецифичной системы геномного редактирования CRISPR/Cas9.

Для получения ауксотрофного штамма выбран прототрофный штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 с высоким экспрессионным потенциалом. Штамм, ауксотрофный по гистидину, выделяли путем инактивации нативного гена *HIS4*, кодирующего фермент гистидинолдегидрогеназу, который участвует в биосинтезе гистидина. Для этого проводили дизайн и получали три варианта гидРНК, нацеленных на кодирующую последовательность гена *HIS4*.

Сконструированы автономно реплицируемые экспрессионные плазмиды, содержащие в своем составе последовательность гена *cas9* из *Streptococcus pyogenes*, а также один из вариантов гидРНК. Для инактивации гена *HIS4* полученные экспрессионные плазмиды трансформировали в штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287. Эффективность инактивации гена *HIS4* с использованием различных гидРНК составила от 65 до 98 %. В результате отобран штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 с инактивированным геном *HIS4*, что было подтверждено результатами секвенирования.

Результаты культивирования показали, что применение системы CRISPR/Cas9 не повлияло на термотолерантность и ростовые характеристики полученного ауксотрофного штамма.

Для сравнения экспрессионного потенциала штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* GS115 сконструирована интегративная экспрессионная кассета, содержащая ген *phyCg-op*, кодирующий фитазу *C. gillenii*, встроенный в единую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида  $\alpha$ -фактора, под контролем промотора АОХ1 и терминатора ТТАОХ1, и дрожжевой селективный маркер *PpHIS4*, комплементирующий у дрожжей *K. phaffii* мутацию в гене *HIS4*. Интегративную экспрессионную кассету трансформировали в штаммы *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* GS115 и произвольно отбирали по 10 трансформантов каждого штамма. Для сравнения уровней продукции фитазы в штаммах *K. phaffii* GS115 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 проводили ферментацию 10 отобранных трансформантов каждого штамма, несущих в составе хромосомы ген, кодирующий фитазу *C. gillenii*. По результатам ферментации определено среднее значение продуктивности трансформантов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013, которое превышало более чем в два раза таковое для трансформантов *K. phaffii* GS115.

Таким образом, отсутствие генов антибиотикорезистентности и достаточно высокая продуктивность трансформантов, получаемых на основе штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5013, относительно продуктивности трансформантов коммерческого штамма *K. phaffii* GS115 расширяют возможность его дальнейшего использования в промышленном биотехнологическом производстве.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2019-1659).

## ИЗГОТОВЛЕНИЕ НЕИММУНОГЕННОГО НЕТОКСИЧНОГО ВЫСОКОРЕГЕНЕРАТИВНОГО БЕСКЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЕТЕРГЕНТНЫМ СПОСОБОМ

Д. В. Товпеко<sup>1</sup>, А. А. Кондратенко<sup>1</sup>, Л. И. Калюжная<sup>1</sup>, В. Е. Чернов<sup>1</sup>, А. В. Нащекин<sup>2</sup>, А. И. Полосков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург

✉ tovpeko.dmitry@gmail.com

### Аннотация

Применение биологических матриксов из децеллюляризованных органов и тканей является новым многообещающим подходом в регенеративной медицине. Благодаря своему составу внеклеточный матрикс из пуповины человека способен к продолжительному функционированию, биосовместим и биоразлагаем, что делает его наиболее подходящим высокорегенеративным биоматериалом гомологичного происхождения.

Поиск новых биосовместимых материалов и разработка на их основе раневых покрытий, способствующих улучшению условий естественного течения раневого процесса, сокращению сроков заживления ран и профилактике патологического рубцевания, остается актуальной задачей для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

В качестве основы для раневых покрытий используют различные материалы природного или синтетического происхождения. В идеале материал должен быть пористым, биосовместимым, неиммуногенным, структурно и функционально близким к нативной структуре заменяемого органа или ткани, а также способствовать адгезии, пролиферации и дифференцировке различных типов клеток, обеспечивая им оптимальное взаимодействие с тканевым микроокружением [1]. Эффективным подходом к созданию неиммуногенных биосовместимых материалов с сохранением структурных и функциональных особенностей естественного внеклеточного матрикса является децеллюляризация органов и тканей.

Согласно опубликованным данным, биоматериал пуповины обладает доказанными регенераторными свойствами. Вартонов студень пуповины человека (WJ) — твердая слизистая соединительная ткань, содержащая различные типы коллагена (I, III, IV и V), гиалуроновую кислоту и обилие регуляторных молекул, включая различные факторы роста, принимающие активное участие во всех стадиях заживления ран [1].

В настоящем исследовании децеллюляризацию WJ проводили детергентным способом растворами додецилсульфата натрия (SDS) по ранее описанному протоколу [2] с использованием различных концентраций: 0,01 и 0,05 %. Эффективность удаления клеток и генетического материала оценивали с помощью флуоресцентного окрашивания DAPI и количественного определения ДНК. Количественный анализ остаточных концентраций SDS в бесклеточном продукте осуществляли масс-спектрометрически методом внешнего стандарта. Сохранность структурного состава подтверждали с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR).

При исследовании окрашенных DAPI препаратов выявили отсутствие ядер клеток в децеллюляризованном WJ (dWJ). Среднее содержание ДНК в WJ составило 507,15 (473,20–539,20) нг/мг сухого веса, в dWJ с использованием раствора SDS с концентрацией 0,05 % — 19,4 (18,0–28,1) нг/мг, а с 0,01 % — 37,8 (35,6–39,8) нг/мг ( $p < 0,001$ ). Остаточная концентрация SDS в полученных продуктах — 0,3196 (0,2912–0,3542) и 0,2144 (0,2087–0,2215) мг/л с 0,05%-м и 0,01%-м растворами соответственно ( $p < 0,05$ ). Использование раствора SDS в концентрации 0,01 % позволяет значительно уменьшить остаточное содержание детергента в продукте в сравнении с применением раствора 0,05 %. Известно, что высокие концентрации SDS ( $> 1$  %) могут привести к утрате структурных молекул и появлению цитотоксических свойств продукта за счет остаточного содержания детергента.

FTIR-спектры WJ и dWJ продемонстрировали аналогичные характеристические полосы поглощения, соответствующие колебаниям функциональных групп, присутствующих в молекулах коллагенов и гликозаминогликанов.

Таким образом, нам удалось показать, что добиться неиммуногенности и нетоксичности бесклеточного матрикса и сохранности основных структурных и функциональных компонентов, важных для процессов заживления ран, возможно при использовании наименьшей эффективной концентрации раствора SDS.

### Литература

1. Fayon A., Helle D., Francius G. et al. Characterization of an Innovative Biomaterial Derived from Human Wharton's Jelly as a New Promising Coating for Tissue Engineering Applications // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Vol. 10. P. 884069.
2. Калюжная Л. И., Чернов В. Е., Фрумкина А. С. и др. Изготовление тканеинженерного бесклеточного матрикса пуповины человека // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. 2020. Т. 22 (1). С. 124–130.

**ТРЕХМЕРНАЯ ГЕТЕРОЯДЕРНАЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ  
ГИПЕРПОЛЯРИЗОВАННОГО ПАРАВОДОРОДОМ ФАМПРИДИНА \***

А. И. Трепакова<sup>1-5</sup>, И. В. Сковпин<sup>1</sup>, Н. В. Чуканов<sup>1,2</sup>, О. Г. Сальников<sup>1,2</sup>,  
Э. Ю. Чекменев<sup>4,5</sup>, А. Н. Правдивцев<sup>6</sup>, Я.-Б. Ховенер<sup>6</sup>, И. В. Коптюг<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>4</sup>Университет Уэйна, Детройт

<sup>5</sup>Российская академия наук, Москва

<sup>6</sup>Университетский медицинский центр Шлезвиг-Гольштейн, Киль

✉ alexandra.svyatova@tomo.nsc.ru

**Аннотация**

Магнитно-резонансная томография (МРТ) активно используется для структурных, функциональных и динамических исследований. Интерес медицинских центров к МРТ обусловлен неинвазивностью и информативностью метода. На текущий момент с помощью МРТ можно обнаружить патологии органов, изучить структуру тканей и различные биологические процессы внутри живого организма. Однако сейчас в МРТ-диагностике не реализуется полный потенциал метода из-за низкой чувствительности, а клинические исследования ограничены использованием только протонов <sup>1</sup>H для регистрации сигнала. Гетероядерная томография может привнести дополнительную и уникальную информацию о метаболизме или распространении лекарств в организме благодаря отсутствию фонового сигнала (из-за <sup>1</sup>H присутствует фоновый сигнал от протонов воды). Дополнительным преимуществом гетероядерной томографии является большая дисперсия химического сдвига, что позволяет расширить диапазон возможных применений МРТ, например следить за метаболомными превращениями. Основная причина малого количества исследований с использованием такого гетероядра, как азот <sup>15</sup>N, для регистрации сигнала — это малое естественное содержание изотопа (0,364 %) и малое значение гироманнитного отношения  $\gamma(^{15}\text{N}) = -4,32 \text{ МГц/Тл}$ .

Данные ограничения можно преодолеть несколькими методами: изотопным обогащением или с помощью методов гиперполяризации (ГП). Основной принцип всех методов ГП — создание неравновесной населенности спиновых уровней, что позволяет получать интенсивность сигнала на 4–5 порядков больше, чем в термическом случае. Один из таких методов ГП — это усиление сигнала в процессе обратимого обмена с параводородом (SABRE), главным преимуществом которого для использования в биомедицинских приложениях является сохранение молекулярной структуры субстрата.

В данной работе в качестве субстрата взят 4-амино[<sup>15</sup>N<sub>1</sub>]пиридин (фампридин). Фампридин применяется для контроля симптомов демиелинизации и расстройств нервно-мышечной передачи. Он восстанавливает проводимость в демиелинированных аксонах за счет блокирования калиевых (K<sup>+</sup>) каналов и усиливает нервно-мышечную передачу за счет увеличения притока кальция (Ca<sup>2+</sup>). В работе [<sup>15</sup>N<sub>1</sub>]фампридин был гиперполяризован с помощью метода SABRE и применения импульсных последовательностей, в результате произошло усиление сигнала в 2000 раз в магнитном поле 9,4 Тл, что соответствует 0,7 % поляризации <sup>15</sup>N. Благодаря этому получены 2 и 3М МР-изображения с использованием ядер <sup>15</sup>N для регистрации сигнала. Значения отношения сигнал/шум достигали 90 в 3М МРТ.

Применение методов гиперполяризации для гетероядерной МРТ открывает новые возможности для биомедицинских исследований, что в дальнейшем улучшит качество медицинской диагностики.

\* Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда (№ 21-73-10105).

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICUS*

О. Р. Узбекова, В. Ю. Новиков, К. С. Рысакова, Н. В. Шумская

*Полярный филиал ВНИРО (ПИНРО им. Н. М. Книповича), Мурманск*

✉ nowitaly@yandex.ru

### Аннотация

В работе исследовано фракционирование гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* с целью выделения белков ферментного препарата. Рассмотрены способы получения комплексного препарата и его предварительной очистки.

Эффективным источником ферментных препаратов (ФП) могут служить отходы промысла и промпереработки морских гидробионтов.

Гепатопанкреас камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*, важнейшего промыслового вида ракообразных на Кольском полуострове, составляет около 8 % от массы животного и содержит ферменты разной субстратной специфичности [1].

Одна из стадий обработки гепатопанкреаса краба при получении ФП — обезжиривание. Простым способом удаления липидов при сохранении ферментной активности является экстракция растворителями [2]. Возможна замена экстракции адсорбцией или соосаждением липидов с коагулянтами, например хитозаном [3]. В этом случае полное удаление липидов не достигается и возможно загрязнение ФП применяемыми реагентами. В промышленности для обезжиривания представляют интерес центробежные сепараторы. Полное извлечение липидов не достигается и в этом случае, и требуется дополнительная экстракция растворителями.

Рассмотрены способы выделения ФП из гепатопанкреаса краба с целью выбора пригодного для промышленной технологии. В качестве объекта исследования использовали гепатопанкреас камчатского краба, выловленного осенью 2021 г.

Исследованы ФП: ацетоновый порошок (ФП0); препарат, полученный после центрифугирования и сушки водного раствора (ФП1); препарат, полученный осаждением белков ацетоном (ФП2).

ФП0 производили последовательно экстракцией липидов из гепатопанкреаса охлажденными до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ацетоном, *n*-бутанолом и повторно ацетоном [2].

Гомогенизированный гепатопанкреас с водой (1 : 2 масс.) центрифугировали при 7500 g (соответствующем промышленному сепаратору) на центрифуге Avanti JA-25 (Beckman) ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 ч). Получали жировую фракцию, водный раствор белков и осадок.

После центрифугирования гепатопанкреаса в жировую фракцию и осадок перешло 98,5 % жира, а в водорастворимой фракции осталось 1,5 %. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

### Распределение жира после центрифугирования гепатопанкреаса краба при факторе разделения 7500 g

Показатель	Жировая фракция	Сухой остаток из водного раствора	Сухой осадок
Массовая доля, %	16,9	9,0	2,8
Доля жира, %	90,1	1,5	8,4

Часть водной фракции сушили в сублиматоре, сухой порошок промывали ацетоном и *n*-бутанолом и получали препарат ФП1. Вторую часть осаждали ацетоном (1 : 2 об.), осадок промывали растворителями и после сушки получали препарат ФП2.

Протеолитическую активность ( $A_{\text{prot}}$ ) определяли методом Ансона [4], экзохитиназную ( $A_{\text{exo}}$ ) — по реакции *N*-ацетилглюкозамина с 4-диметиламинобензальдегидом [5]. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

### Протеолитическая ( $A_{\text{prot}}$ ) и экзохитинолитическая ( $A_{\text{exo}}$ ) активность ФП после центрифугирования и переосаждения

Активность	ФП0	ФП1	ФП2
$A_{\text{prot}}$ , мкмоль Туг/г	144,0	252,1	882,9
$A_{\text{exo}}$ , мкмоль ClcNAc/г	0,15	0,94	2,74



В ФП1 протеолитическая активность увеличилась в 1,8, хитиназная — в 6,3 раза, а при осаждении белков ацетоном в ФП2 — в 6 и 18 раз соответственно по сравнению с ФП0.

Таким образом, осаждение водорастворимых ферментов ацетоном после центрифугирования гепатопанкреаса приводит к обогащению ФП протеолитическими и хитинолитическими ферментами. Способ может быть совмещен с предварительным сепарированием гепатопанкреаса для удаления липидов и нерастворимых веществ.

#### **Литература**

1. Ponomareva T., Timchenko M., Filippov M. et al. Prospects of red king crab hepatopancreas processing: fundamental and applied biochemistry // *Recycl.* 2021. Vol. 6, № 1. Article ID 3.
2. Пат. SU 1343591. Способ получения коллагеназы / Сахаров И. Ю., Джунковская А. В., Артюков А. А. и др. Заявл. 13.12.85; опубл. 30.04.92.
3. Новиков В. Ю., Мухин В. А. Использование растворов хитозана для обезжиривания и осветления белковых гидролизатов // *Прикл. биохим. микробиол.* 2001. Т. 37, № 6. С. 733–738.
4. Лисицын А. Б., Иванкин А. Н., Неклюдов А. Д. Методы практической биотехнологии. М.: ВНИИМП, 2001. 408 с.
5. Reissig J. L., Strominger J. L., Leloir L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars // *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 217, № 2. P. 959–966.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ В ОТНОШЕНИИ *ENV*-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1\*

А. А. Фандо<sup>1,2</sup>, Н. Б. Рудомётова<sup>1</sup>, Н. С. Щербакова<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1</sup>,  
В. В. Фоменко<sup>3</sup>, О. И. Яровая<sup>3</sup>, Н. Ф. Салахутдинов<sup>3</sup>, Л. И. Карпенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

✉ [nastyafando@gmail.com](mailto:nastyafando@gmail.com)

### Аннотация

Данная работа направлена на исследование антивирусной активности глицирризиновой кислоты и ее производных в отношении *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1. Показано, что глицирризиновая кислота не проявляет противовирусной активности, в то время как ее производные (различные смеси сложных эфиров никотиновой и глицирризиновой кислот), напротив, продемонстрировали антивирусное действие в отношении *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1.

В настоящее время поиск новых препаратов, способных противодействовать ВИЧ-1, — актуальная задача, поскольку такие факторы, как высокая частота генетических изменений в процессе репликации ВИЧ, развивающаяся при этом устойчивость (резистентность) к используемым препаратам, их высокая токсичность и стоимость, затрудняют борьбу с вирусом. Многообещающим направлением в создании новых антиретровирусных препаратов является разработка ингибиторов проникновения ВИЧ-1, которые препятствуют доступу вируса в клетки-мишени. Для поиска и оценки эффективности таких препаратов активно применяется технология *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1. Один из привлекательных объектов как основа для новых антиретровирусных препаратов — глицирризиновая кислота и ее производные.

Цель работы — исследование антивирусной активности глицирризиновой кислоты и ее производных в отношении *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1.

В данной работе в отношении *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1, относящихся к подтипу В и рекомбинантной форме CRF63\_02A, исследована противовирусная активность 15 препаратов на основе глицирризиновой кислоты, которые были синтезированы и предоставлены сотрудниками лаборатории физиологически активных соединений НИОХ СО РАН. Среди протестированных образцов один препарат представляли собой чистую глицирризиновую кислоту, семь — смесевые композиции сложных эфиров никотиновой и глицирризиновой кислот (основные продукты: триникотинаты глицирризиновой кислоты); два препарата — дегидратированные формы триникотинатов глицирризиновой кислоты; четыре препарата — смеси сложных эфиров никотиновой и глицирризиновой кислот (основные продукты: мооникотинаты глицирризиновой кислоты). На первом этапе для тестируемых образцов исследована цитотоксичность в отношении клеточной линии TZM-bl. В результате показано, что диапазон  $CC_{50}$  для данных препаратов составил 250–1000 мкМ.

На втором этапе проведено исследование противовирусной активности препаратов с использованием *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1. В результате установлено, что наибольшую ингибирующую активность проявили триникотинаты глицирризиновой кислоты, для которых диапазон значений  $IC_{50}$  и SI составил 2,88–79,43 и 13–347 мкМ соответственно. Среди мооникотинатов глицирризиновой кислоты противовирусное действие продемонстрировал один препарат:  $IC_{50}$  и SI — 18,87 и 53 мкМ соответственно. Диапазон значений  $IC_{50}$  и SI для дегидратированных форм триникотинатов глицирризиновой кислоты составил 20,41–123 и 4–49 мкМ соответственно. При этом показано, что чистая глицирризиновая кислота не проявляет ингибирующих свойств. Действие наиболее активного препарата (триникотинаты глицирризиновой кислоты) осуществляется на этапе проникновения вирусной частицы в клетку-мишень.

\* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКЕТОВ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛАККАЗ В КАТОДНОМ ПРОСТРАНСТВЕ\*

В. В. Федина, С. В. Алферов

Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, Научно-исследовательский центр «БиоХимТех»,  
Тульский государственный университет

✉ agapovaweronica@yandex.ru

### Аннотация

Биотопливным элементом (БТЭ) принято называть топливные элементы, где для преобразования энергии в катодном и/или анодном пространстве используют биокатализаторы. Достиженные успехи в области создания биоэлектрокатализаторов открывают перспективы их практического применения для реакции катодного отделения при восстановлении кислорода. Выяснение механизма биоэлектрокатализа кислородной реакции играет ключевую роль для конструирования макетов БТЭ.

БТЭ могут стать одним из будущих важных практических применений в электрохимической энергетике и биотехнологии. Для создания макетов БТЭ используют различные биокатализаторы [1]. В данной работе проводили формирование графитового биоанода с помощью мембранной фракции бактерий *Gluconobacter oxydans* с токопроводящей матрицей на основе хитозана с углеродными нанотрубками (рис. 1). Бактерии *G. oxydans* обладают уникальной ферментной системой, в их мембране находятся пирролохинолинхинон (PQQ)-зависимые дегидрогеназы, что обуславливает возможность выделения их мембранной фракции [2].

Для формирования катодного отделения использовали графитовый электрод, модифицированный углеродными нанотрубками, с лакказами бактерий *Catenuloplanes japonicus* или *Streptomyces ochraceiscleroticus*. Их закрепляли на поверхности электрода белковой пленкой бычьего сывороточного альбумина (см. рис. 1). Благодаря лакказам увеличивается скорость переноса электронов на кислород в катодном пространстве биотопливного элемента, что повышает его энергетические характеристики [3].

В результате работы макета БТЭ при использовании на биоаноде лакказ бактерий *Catenuloplanes japonicus* получены следующие энергетические характеристики: генерируемый потенциал в режиме разомкнутой цепи  $E = 330 \pm 17$  мВ, в режиме замкнутой цепи  $E = 134 \pm 12$  мВ; выходная мощность  $P = 20 \pm 1 (*10^{-4})$  Вт достигнута при внешнем сопротивлении  $R = 10$  кОм. При работе второго макета БТЭ с лакказой бактерий *Streptomyces ochraceiscleroticus* энергетические характеристики несколько отличались: генерируемый потенциал в режиме разомкнутой цепи  $E = 250 \pm 14$  мВ, в режиме замкнутой цепи  $E = 141 \pm 14$  мВ, выходная мощность  $P = 27 \pm 3 (*10^{-4})$  Вт, внешнее сопротивление  $R = 9$  кОм. Зависимость мощности топливных элементов от приложенного внешнего сопротивления представлена на рис. 2.

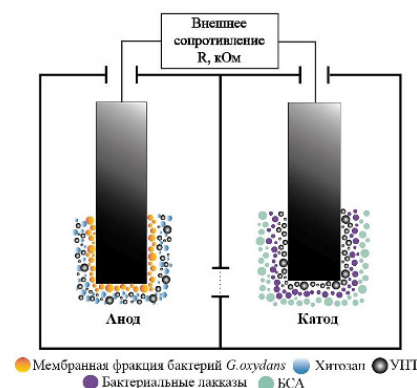


Рис. 1. Макет БТЭ на основе мембранной фракции бактерий *G. oxydans* в анодном пространстве и бактериальных лакказ в катодном пространстве

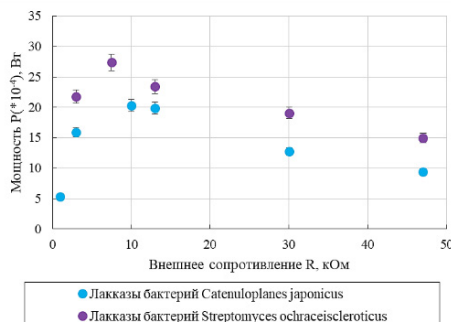


Рис. 2. График зависимости мощности от внешнего сопротивления БТЭ с биоанодами на основе различных бактериальных лакказ

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности (проект № FEWG-2021-0013) — «Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами».

Сравнительная характеристика макетов БТЭ с бактериальными лакказами представлена в таблице.

**Сравнительная характеристика производительности макетов БТЭ  
при использовании различных бактериальных лакказ**

Бактериальные лакказы	Характеристика			
	$E$ (мВ) в режиме разомкнутой цепи	$E$ (мВ) в режиме замкнутой цепи	Мощность $P(10^{-4})$ , Вт	Внешнее сопротивление $R$ , кОм
<i>S. japonicus</i>	$330 \pm 17$	$134 \pm 12$	$20 \pm 1$	10
<i>S. ochraceiscleroticus</i>	$250 \pm 14$	$141 \pm 14$	$27 \pm 3$	9

Как можно видеть, генерируемый потенциал с лакказами *Streptomyces ochraceiscleroticus* в режиме разомкнутой цепи ниже, однако производительность макета БТЭ выше, так как выходная мощность и генерируемый потенциал в режиме замкнутой цепи в несколько раз выше при приложенном внешнем сопротивлении  $R = 9$  кОм.

В исследовании [4] использовали грибные лакказы *Ganoderma lucidum*. Объем анодного и катодного пространства 350 мл. Материал анода — углеродный войлок, а катода — углеродная ткань. Напряжение разомкнутой цепи составило 821 мВ, а замкнутой — 394 мВ с мощностью  $1,34 \cdot 10^{-4}$  Вт при внешнем сопротивлении 1 кОм. Сравнительная характеристика производительности разработанных макетов БТЭ с литературными данными приведена на рис. 3.

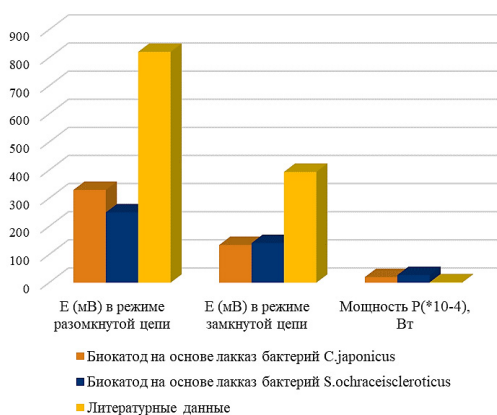


Рис. 3. Сравнение разработанных макетов БТЭ с литературными данными

Таким образом, максимальная мощность рассматриваемых макетов БТЭ выше при использовании бактериальных лакказ, чем грибных. Однако на работу МТЭ могут оказывать влияние различные факторы, такие как объем ячеек, применение других биокатализаторов в анодном пространстве и вспомогательных соединений в катодном.

### Литература

1. Богдановская В. А. Биоэлектрокатализаторы и перспективы создания биотопливных элементов на их основе // Альтернативная энергетика и экология. 2010. № 5. С. 129–131.
2. Tkac J., Svitel J., Vostiar I. et al. Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis // Bioelectrochem. 2009. № 76. P. 53–62.
3. Mate D. M., Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology // Microb. Biotechnol. 2017. T. 10, № 6. P. 1457–1467.
4. Lai C. Y. et al. Decolorization of azo dye and generation of electricity by microbial fuel cell with laccase-producing white-rot fungus on cathode // Appl. Energy. 2017. T. 188. P. 392–398.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ И КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА НА МОРФОГЕНЕЗ РАСТЕНИЙ КОК-САГЫЗА (*TARAXACUM KOK-SAGHYZ* R.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* \*

С. И. Филатова<sup>1</sup>, Л. Ю. Мартиросян<sup>1</sup>, Е. Р. Мягкова<sup>2</sup>, Ю. Ц. Мартиросян<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

✉ levon-agro@mail.ru

### Аннотация

Одуванчик кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* R.) — перспективный каучуконос, активно изучаемый в РФ и за рубежом [1, 2]. Применение современных достижений био- и нанотехнологии призвано способствовать существенному повышению рентабельности этой культуры. Изучено влияние наночастиц серебра и коллоидного раствора серебра на морфогенез *in vitro* растений кок-сагыз и накопление каучука и инулина.

Выравненные по внешнему виду растения кок-сагыз стерильно высаживались на среду Кворина — Лепуавра (QL), дополненную двумя вариантами наночастиц разных размеров и коллоидным раствором серебра в различных концентрациях (табл. 1).

Таблица 1

### Содержание и формы серебра в питательной среде QL

№ варианта	Формы серебра (Ag) в культуральной среде	Концентрация Ag мг/мл
1	Контроль	0
2	Коллоидный р-р Ag	0,00075
3	Коллоидный р-р Ag	0,003
4	Коллоидный р-р Ag	0,006
5	Коллоидный р-р Ag	0,009
6	Наночастицы Ag 20 нм	0,0008
7	Наночастицы Ag 20 нм	0,0016
8	Наночастицы Ag 20 нм	0,0025
9	Наночастицы Ag 20 нм	0,0033
10	Наночастицы Ag 40 нм	0,0003
11	Наночастицы Ag 40 нм	0,0006
12	Наночастицы Ag 40 нм	0,001
13	Наночастицы Ag 40 нм	0,0013

Спустя 30 дней оценивали такие показатели, как площадь листьев, длина и масса листьев, корней и растений целиком. Установлено, что раствор коллоидного серебра 0,003 мг/мл (вариант 3) благоприятно влияет на высоту растений, а концентрация коллоидного раствора 0,00075 мг/мл (вариант 2) — на массу корней. Наночастицы Ag 20 нм почти не оказывают воздействия на высоту растений. На параметры массы положительно влияет концентрация данных частиц в варианте 8 (0,0025 мг/мл). Наночастицы Ag 40 нм (варианты 10–13) ингибируют процессы роста растений кок-сагыз.

Положительно воздействует на площадь листьев только коллоидный раствор серебра: наибольшее значение получено при использовании 0,00075 мг/мл раствора (вариант 3).

Для анализа на содержание каучука и инулина взяты корни растений, культивируемых *in vitro* с добавлением различных форм серебра (табл. 2).

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ, проект № 20-316-90032/20.

© С. И. Филатова, Л. Ю. Мартиросян, Е. Р. Мягкова, Ю. Ц. Мартиросян, 2022

Таблица 2

**Сравнение содержания каучука и инулина в корнях растений кок-сагыза, выращенных на средах QL с добавлением различных форм серебра**

№	Форма и концентрация Ag в культуральной среде, мг/мл	Каучук, %	Инулин, %
1	Контроль	3,4 ± 0,6	6,6 ± 0,4
2	Ag коллоидное (0,00075)	9,5 ± 0,8	16,4 ± 0,7
3	Ag коллоидное (0,003)	5,4 ± 1,0	24,3 ± 1,2
4	Ag коллоидное (0,009)	5,2 ± 0,7	22,2 ± 1,1
5	Ag 20 нм (0,0008)	1,8 ± 0,2	12,9 ± 0,8
6	Ag 20 нм (0,0016)	4,9 ± 0,3	19,7 ± 0,9
7	Ag 40 нм (0,001)	5,4 ± 0,7	19,5 ± 0,9
8	Ag 40 нм (0,0013)	5,9 ± 0,8	15,2 ± 1,3

Анализ показал благоприятное воздействие всех форм серебра на содержание инулина. Коллоидное серебро в концентрации 0,00075 мг/мл (вариант 2) стимулировало образование каучука, но при этом негативно влияло на содержание инулина по сравнению с другими концентрациями данного вещества.

Содержание каучука в варианте 5 составляло 1,8 %, что почти в 2 раза меньше контрольного образца, а содержание инулина, напротив, увеличилось в 2 раза. Таким образом, повышение концентрации наночастиц Ag 20 нм стимулировало биосинтез каучука и инулина.

Концентрации наночастиц Ag 40 нм в 7 и 8 варианте показали похожие результаты по каучуку, однако вариант 7 продемонстрировал лучший результат по содержанию инулина.

Для достижения рентабельности производства каучука и инулина из кок-сагыза необходимы дополнительные исследования, в том числе изучение особых потребностей растения и оптимизация минерального питания.

#### **Литература**

1. Америк А. Ю., Мартиросян Ю. Ц., Мартиросян Л. Ю. и др. *Parthenium argentatum* A. Gray, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse как альтернативные источники натурального каучука: нужны ли они нам? // С.-х. биология. 2022. Т. 57, № 1. С. 3–26.
2. Arias M., Herrero J., Ricobaraza M. et al. Evaluation of root biomass, rubber and inulin contents in nine *Taraxacum kok-saghyz* Rodin populations // Ind. Crops Products. 2016. Vol. 83. P. 316–321.

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ АССОЦИИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ БПК И ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД\*

А. С. Харькова, Р. В. Лепикаш, Т. В. Лаврова, В. А. Арляпов

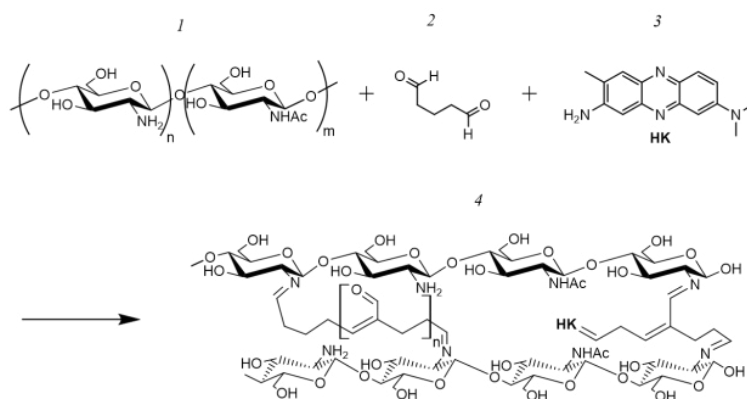
Тульский государственный университет

✉ Anyuta\_Zaytseva@mail.ru

### Аннотация

Композитный материал на основе модифицированного нейтральным красным хитозана и углеродных нанотрубок использован для иммобилизации двух ассоциаций для оценки биохимического потребления кислорода (нижняя граница определяемых концентраций  $0,6 \text{ мгО}_2/\text{дм}^3$ ) и токсичности водных сред.

В работе применен редокс-активный полимер на основе хитозана и электроактивного вещества нейтрального красного (см. рисунок) для формирования рецепторных систем экспресс-анализа индекса биохимического потребления кислорода (БПК) и токсичности.



Синтез редокс-активного полимера: 1 — хитозан; 2 — глутаровый альдегид;  
3 — нейтральный красный; 4 — редокс-активный полимер

На ИК-спектре редокс-активного полимера отсутствует полоса поглощения  $1270 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая валентным колебаниям первичной аминогруппы нейтрального красного, при этом наблюдается широкая полоса поглощения  $1650 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая валентным колебаниям связи  $\text{C}=\text{N}$ . Спектрофотометрически установлено, что в полимере содержится 3 % (масс.) электроактивного вещества.

Электрохимические свойства рецепторных систем на основе редокс-полимера и микроорганизмов изучены методом циклической вольтамперометрии. Выявлено, что редокс-полимер обладает достаточно низкой скоростью переноса электронов на электрод: гетерогенная константа скорости составляет  $0,054 \pm 0,003 \text{ см}^2/\text{с}$ . При добавлении к редокс-полимеру углеродных нанотрубок (УНТ) повышается скорость переноса электронов на порядок (см. таблицу). Кроме того, установлено, что при добавлении УНТ увеличивается константа скорости взаимодействия редокс-частиц полимера с микроорганизмами.

Для анализа токсичности водных сред иммобилизовали ассоциацию бактерий *P. yeii* и дрожжей *S. cerevisiae* в композитный материал «редокс-активный полимер — УНТ». Для оценки БПК использовали ассоциацию дрожжей *B. adenivorans* и *O. polymorpha*. Схожесть удельных скоростей роста микроорганизмов в ассоциациях позволяет избежать контаминации в ходе эксплуатации аналитической системы. Разработанные рецепторные элементы обладают высокой долговременной надежностью: ассоциация *P. yeii* и *S. cerevisiae* стабильно работает в течение 5 суток, при этом, как правило, биоэлектроды для оценки токсичности являются одноразовыми системами [1]. Долговременная стабильность рецепторного элемента на основе дрожжей *B. adenivorans* и *O. polymorpha* (25 суток) не уступает рецепторным элементам на базе индивидуальных культур [2]. Рецепторный элемент на основе дрожжей *B. adenivorans* и *O. polymorpha* (нижняя граница определяемых значений БПК —  $0,6 \text{ мгО}_2/\text{дм}^3$ ) по-

\* Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (№ МК-4815.2022.1.4).

зволяет проводить анализ проб, значение БПК которых ниже ПДК —  $4 \text{ мгО}_2/\text{дм}^3$ . Оба рецепторных элемента обладают высокой операционной стабильностью аналитического сигнала и воспроизводимостью. Предложенные системы в перспективе могут быть использованы в качестве прототипов комплектующих для экспресс-приборов ранней диагностики состояния водных сред.

#### Изменение электрохимических свойств редокс-полимера при добавлении УНТ

Константа скорости	Редокс-активный полимер	Редокс-активный полимер — УНТ
Гетерогенная константа скорости переноса электронов на электрод, см/с	$0,054 \pm 0,003$	$0,14 \pm 0,01$
Константа скорости взаимодействия редокс-частиц полимера с дрожжами <i>B. adenivorans</i> , $\text{дм}^3/\text{г} \times \text{с}$	$0,066 \pm 0,002$	$0,31 \pm 0,03$
Константа скорости взаимодействия редокс-частиц полимера с дрожжами <i>O. polymorpha</i> , $\text{дм}^3/\text{г} \times \text{с}$	$0,00065 \pm 0,0002$	$0,0034 \pm 0,0001$
Константа скорости взаимодействия редокс-частиц полимера с дрожжами <i>S. cerevisiae</i> , $\text{дм}^3/\text{г} \times \text{с}$	$0,076 \pm 0,002$	$0,088 \pm 0,004$
Константа скорости взаимодействия редокс-частиц полимера с бактериями <i>P. yeii</i> , $\text{дм}^3/\text{г} \times \text{с}$	$0,043 \pm 0,002$	$0,051 \pm 0,002$

#### Литература

1. Hassan S. H., Ginkel S. V., Hussein M. A. M. et al. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors // Environ. Int. 2016. Vol. 92. P. 106–118.
2. Kharkova A. S., Arlyapov V. A., Ilyukhina A. S. et al. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay // 3 Biotech. 2021. Vol. 11, is. 5. P. 1–13.



## ЭКСПРЕССИЯ АДАМАЛИЗИН-ПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *B. PUMILUS*, НАХОДЯЩЕЙСЯ ПОД КОНТРОЛЕМ СИСТЕМЫ ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА DegS-DegU\*

Д. И. Хасанова, Н. Л. Рудакова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ natalialrudakova@mail.ru

### Аннотация

Экспрессия уникальной адамализиноподобной металлопротеиназы *Bacillus pumilus* с неизвестной функцией позитивно регулируется двухкомпонентной системой трансдукции сигнала DegS-DegU.

Внеклеточная металлоэндопептидаза MprBp *Bacillus pumilus* 3-19 — минорный белок с невыясненной функцией. На основании первичной структуры фермент классифицирован как металлопротеиназа клана метцинкинов, сочетающая признаки двух семейств: астацинов и адамализинов. Он является первым прокариотическим гомологом семейства эукариотических адамализинов [1]. Выяснение регуляторных сетей, управляющих экспрессией гена, позволит оценить вклад этого фермента в интегрированный клеточный ответ.

Анализ промоторной области гена показал наличие четырех потенциальных сайтов связывания с фосфорилированной формой белка DegU~P двухкомпонентной системы биodeградации. Это подразумевает участие регуляторной пары DegS-DegU в контроле экспрессии гена *mprBp*.

Для дальнейшего изучения роли системы DegS-DegU в регуляции экспрессии металлопротеиназы ген *mprBp* в составе плазмиды pSA1 под собственным промотором проклонирован в рекомбинантные штаммы, дефектные по генам регуляторной системы DegS-DegU. Клонирование гена *mprBp* в штамм *B. subtilis* 8G5  $\Delta degS-degU$ , дефектный по генам *degS* и *degU*, показало трехкратное снижение продуктивности металлопротеиназы по сравнению с продуктивностью штамма с функциональным опероном *degS-degU*. Это позволило предположить, что система DegS-DegU оказывает позитивное влияние на экспрессию гена *mprBp*.

Также изучали экспрессию *mprBp* в штамме *B. subtilis* 8g5 DegU32 (Hy), у которого мутация в гене *degU* приводит к стабилизации белка DegU~P. Известно, что эта мутация способствует многократному повышению уровня экспрессии генов, позитивно регулируемых системой DegS-DegU. Полученные данные показали 10-кратное увеличение продуктивности металлопротеиназы в рекомбинантном штамме *B. subtilis* 8G5 *degU32* (Hy) и позволили заключить, что фосфорилированная форма белка DegU активирует экспрессию гена *mprBp*.

Таким образом, регуляторная пара DegS-DegU позитивно регулирует экспрессию гена металлопротеиназы, которая участвует в адаптационных процессах клетки, протекающих в переходный период к стационарной фазе роста, когда активируются многие системы сигнальной трансдукции.

### Литература

1. Sabirova A. R., Rudakova N. L., Balaban N. P et al. A novel secreted metallopro- teinase *Bacillus intermedius* — the first adamalysin-like enzyme from bacilli // FEBS Lett. 2010. Vol. 584. P. 4419–4425.

\* Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

© Д. И. Хасанова, Н. Л. Рудакова, 2022

## ПРИМЕНЕНИЕ ПАРАДИГМЫ *QUALITY BY DESIGN* В РАЗРАБОТКЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

З. Р. Хасаншина, И. А. Корнаков, В. Ф. Латыпов

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

✉ zuhra.hasanshina@geropharm.com

### Аннотация

Условия индукции — критический показатель культивирования промышленных штаммов *E. coli*. Определены критические параметры процесса индукции. Данные показатели оптимизированы с использованием *Design of Experiments*, что позволило увеличить продуктивность более чем на 180 и 60 % для продуцентов пептида и проинсулина соответственно. Показана возможность масштабирования с колб в биореактор в рамках валидации модели. Критерий успешности валидации — сохранение удельной продуктивности.

Прошло четыре десятилетия с тех пор, как в *Escherichia coli* был получен первый рекомбинантный белок. В настоящее время *E. coli* является популярной системой экспрессии для производства биофармацевтических продуктов.

Получение рекомбинантного белка с высоким выходом — одна из основных задач фармацевтической разработки. Определение наиболее важных факторов для оптимальной экспрессии белка может потребовать значительных временных затрат и большого количества экспериментов при использовании традиционного подхода *One factor at the time* (OFAT). При этом подходе недостатки технологии часто приходится устранять уже на этапе производства.

Современный подход к разработке эффективных и надежных производственных процессов и обеспечения качества терапевтического белка опирается на парадигму *Quality by design* (QbD) в сочетании с статистическими методами *Design of experiments* (DoE). Подход QbD позволяет не только эффективно использовать время, выделенное на разработку, но и полноценно изучить процесс с научной точки зрения. Центральной концепцией принципа является оценка взаимосвязей между параметрами процесса и атрибутами качества продукта.

Цель настоящей работы — анализ и оптимизация условий культивирования бактериальных штаммов-продуцентов рекомбинантных белков с помощью подхода QbD.

В данной работе показано, что условия индукции являются критическими показателями процесса культивирования рекомбинантных штаммов *E. coli*. Выбор потенциальных критических параметров процесса (*potential critical process parameters*, pCPP) индукции обоснован с применением диаграммы Исикавы. В итоге определены четыре pCPP: оптическая плотность индукции, температура и pH культивирования, концентрация индуктора.

Проведена оптимизация условий индукции растворимого пептида с помощью методологии DoE в колбах. Показано, что использование DoE позволяет сократить время на разработку в 5 раз, а количество экспериментов — в 3 раза по сравнению с традиционным методом OFAT. При этом продуктивность штамма увеличена более чем на 180 % по сравнению со стартовыми условиями культивирования бактериальных штаммов. Условия, предсказанные моделью, успешно валидированы в 5-литровом биореакторе.

Также оптимизированы условия индукции штамма-продуцента проинсулина. Определены проектные поля процесса и взаимодействие pCPP в колбах. Проведена валидация условий индукции в биореакторе объемом 5 л. Удельная продуктивность штамма-продуцента проинсулина увеличена более чем на 60 % по сравнению с исходной технологией культивирования. Таким образом, условия, определенные ранее с использованием OFAT, не являются оптимальными.

В рамках данной работы показана возможность масштабирования условий индукции *E. coli* с колб в биореактор в рамках валидации модели. Для этого при планировании эксперимента по оптимизации необходимо учитывать диаметр колбы, наличие перегородки, объем питательной среды и скорость перемешивания. Успешное масштабирование возможно при сравнении кинетики роста в колбах и биореакторе для определения фазы роста культуры для индукции. Критерий успешности валидации — сохранение удельной продуктивности.

### Заключение

Определение и оптимизация критических параметров процесса культивирования — важный этап фармацевтической разработки. В данной работе с помощью подхода QbD определены критические параметры процесса индукции. Они оптимизированы с использованием DoE для штаммов-продуцентов пептида и проинсулина, что позволило значительно увеличить продуктивность штаммов при сокращении количества экспериментов. Показано, что возможно масштабирование с колб в биореактор в рамках валидации модели.

Результаты данного исследования позволили повысить эффективность производства пептида и проинсулина в промышленных масштабах.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА И ВИТАМИН-В-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* B-2213 В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ, ИМИТИРУЮЩЕЙ ТОЛСТЫЙ КИШЕЧНИК\*

Н. Ю. Хромова, Ю. М. Епишкина

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

✉ khromova.n.i@muctr.ru

### Аннотация

В работе исследован рост и оценена способность *Lactobacillus acidophilus* B-2213 синтезировать водорастворимые витамины группы В в среде, имитирующей толстый кишечник. Методом капиллярного электрофореза установлены концентрации водорастворимых витаминов группы В в культуральной жидкости по мере увеличения продолжительности ферментации. Обнаружено, что спустя 24 ч культивирования *L. acidophilus* B-2213 на модельной кишечной среде в культуральной жидкости происходило накопление пантотеновой кислоты.

Использование в составе пробиотических препаратов штаммов с доказанной способностью синтезировать витамины группы В — один из перспективных способов борьбы с авитаминозами населения. Предполагается, что такие штаммы при достижении дистальной части кишечника и после его колонизации смогут синтезировать витамины *in vivo* [1]. Перед пищевыми и синтетическими микробные витамины имеют важное преимущество: выработка и всасывание происходит в толстом кишечнике, где они могут выступать как питательные вещества для хозяина и микробиоты, регуляторы активности популяций иммунных клеток, медиаторы эффективности лекарственных средств, протекторы выживания или приспособленности определенных бактерий, супрессоры колонизации патогенными бактериями, модуляторы колита [2]. Молочнокислые бактерии, синтезирующие фолиевую кислоту и рибофлавин, могут использоваться в качестве дополнительного лечения у людей, страдающих воспалительными заболеваниями кишечника [3].

**Цель работы** — исследование роста и оценка способности штамма лактобактерий *L. acidophilus* B-2213 синтезировать водорастворимые витамины группы В в модельной кишечной среде.

Штамм *L. acidophilus* B-2213 получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва, Россия). Для производства инокулята лактобациллы культивировали в стандартной среде MRS при 37 °С в течение 24 ч. Для определения способности лактобактерий продуцировать витамины группы В в условиях, имитирующих толстый кишечник, использовали питательную среду следующего состава (г/л): триптон — 2,0; дрожжевой экстракт — 2,0; NaCl — 0,1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O — 0,04; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,04; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 0,01; CaCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O — 0,01; NaHCO<sub>3</sub> — 2,0; L-цистеин — 0,5; глюкоза — 8,0; витамин К (водорастворимый аналог) — 0,01; соли желчных кислот — 0,35; гемин — 0,02; камедь — 1,0; пектин — 2,0; крахмал — 2,0. Лактобактерии культивировали при 37 °С в течение 24 ч. Их численность устанавливали методом последовательных десятикратных разведений с высевом на плотные питательные среды MRS. Определение содержания водорастворимых витаминов группы В в образцах проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель — 105М» («Люмэкс», Санкт-Петербург) согласно практическому руководству [4] и методике М 04-72-2011 [5]. Стандарты всех витаминов группы В для калибровки приобретены у «Люмэкс» (Санкт-Петербург).

Кривая роста *L. acidophilus* B-2213 в искусственной кишечной среде представлена на рисунке. Стационарная фаза роста наступала на 16-й ч культивирования, численность лактобактерий на 24-й ч ферментации составила 2,96×10<sup>8</sup> КОЕ/мл.

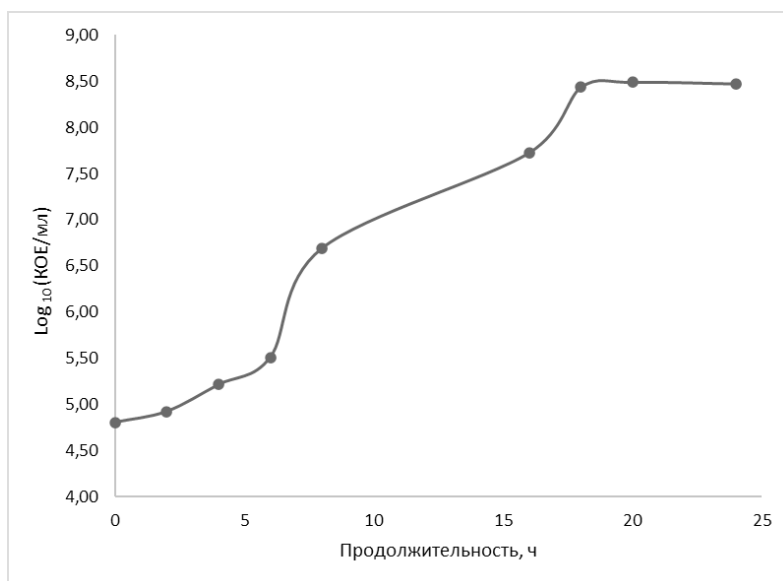
Результаты анализа накопления водорастворимых витаминов группы В в культуральной жидкости в ходе культивирования представлены в таблице.

### Содержание водорастворимых витаминов группы В в культуральной жидкости *L. acidophilus* B-2213 при культивировании в искусственной кишечной среде

Продолжительность культивирования, ч	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>c</sub>
0	–*	–	–	8,224	1,722	1,011
12	–	–	–	8,134	1,700	–
24	–	–	4,352	8,403	1,531	–

\* Не обнаружено.

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-1171.2021.5).



Кривая роста *L. acidophilus* B-2213  
при культивировании на искусственной кишечной среде

На основании полученных результатов установлено, что, несмотря на богатый питательный состав модельной кишечной среды, численность жизнеспособных лактобактерий после 24 ч культивирования не достигала  $10^9$  и составила не более  $3,0 \times 10^8$  КОЕ/мл. Анализ способности лактобактерий *L. acidophilus* B-2213 синтезировать водорастворимые витамины группы В показал, что они могут внеклеточно накапливать в среде витамин В<sub>3</sub> — пантотеновую кислоту.

#### Литература

1. Arena M. P. et al. Probiotic abilities of riboflavin-overproducing Lactobacillus strains: A novel promising application of probiotics // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98. P. 7569–7581.
2. Uebanso T. et al. Functional roles of B-vitamins in the gut and gut microbiome // Mol. Nutrition Food Res. 2020. Vol. 64 (18). P. 2000426.
3. Leblanc J. G., Levit R., De Giori G. S., Leblanc A. D. M. D. Application of vitamin-producing lactic acid bacteria to treat intestinal inflammatory diseases // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. Vol. 104. P. 3331–3337.
4. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: ООО «Веда», 2006. Т. 212.
5. М 04-72-2011. Методика измерений содержания свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных концентратах, смесях и добавках, в том числе жидких, методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105/105М».

## ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО СОСТАВА И КОНКУРЕНТНЫХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАЦИЛЛ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА\*

Л. Х. Хуснуллина<sup>1</sup>, Д. Р. Хуснутдинова<sup>1,3</sup>, А. М. Харченко<sup>1</sup>, М. Н. Синягина<sup>1</sup>,  
М. И. Маркелова<sup>1,3</sup>, С. Р. Абдулхаков<sup>1,2</sup>, Т. В. Григорьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет

<sup>3</sup>Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

✉ khusnullinaliya@gmail.com

### Аннотация

Лактобациллы — резидентные представители микробиоты кишечника человека. Обладая высоким пробиотическим потенциалом, они широко распространены в качестве лечебно-профилактических препаратов для облегчения симптомов различных расстройств, в том числе при болезни Крона (БК) и других воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК).

На тяжесть и развитие ВЗК влияет как патогенная, так и комменсальная микробиота кишечника при потере иммунологической толерантности к ней организма. Некоторые исследования кишечной микробиоты при ВЗК выявили ассоциации острой фазы с увеличением представленности *Lactobacillus*, в частности *L. salivarius*, *L. gasseri* и *L. mucosae* [1]. Вероятно, данные представители обладают конкурентными преимуществами по сравнению с нормальной микрофлорой. В связи с этим цель данного исследования — провести сравнительную характеристику штаммов *Lactobacillus* от пациентов с БК и здоровых добровольцев.

В ходе исследования проанализированы образцы кала от 4 пациентов с БК и 10 здоровых добровольцев. Выделение и культивирование штаммов *Lactobacillus* из образцов кала проводили с использованием среды MRS (ФБУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия). Идентификацию бактерий осуществляли с помощью масс-спектрометра Microflex с системой MALDI Biotyper (*Bruker Daltonics*, Германия). Гемолитическую активность проверяли на кровяном агаре. Антагонистическую активность оценивали методом гало-теста. Индекс кислотообразования рассчитывали по формуле  $I_k = \Delta pH / ОП590$ , где  $\Delta pH$  — изменение pH среды MRS, ОП590 — оптическая плотность культуры за 48 ч роста лактобацилл при 37 °С.

В результате микробиологического посева на среду MRS образцов микробиоты кишечника здоровых добровольцев и пациентов с БК выделены и идентифицированы следующие штаммы: *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. fermentum*. При БК характерна повышенная частота встречаемости таких видов, как *L. salivarius* (75 % — БК, 20 % — среди здоровых), *L. gasseri* (50 % — БК, 20 % среди здоровых) по сравнению со здоровыми добровольцами. Все выделенные штаммы данных видов образуют на кровяном агаре зоны  $\alpha$ -гемолиза. Индекс кислотообразования у штаммов, выделенных от пациентов с БК, выше ( $1,58 \pm 0,07$ ,  $p = 0,02$ ), чем у здоровых добровольцев ( $1,46 \pm 0,04$ ). Результаты антагонистической активности *L. salivarius* и *L. gasseri* представлены в таблице.

Источник	Тестируемые штаммы	Зона ингибирования роста, мм								
		<i>L. plantarum</i> 8p-a3	<i>L. salivarius</i> A5-1-10	<i>L. salivarius</i> A7-1-15	<i>L. gasseri</i> A4-2-1(12)	<i>L. gasseri</i> A15-1-8	<i>L. salivarius</i> 144/2021-8	<i>L. salivarius</i> 198 vzk — 4	<i>L. gasseri</i> 100/2021-13	<i>L. salivarius</i> 098/2021-6
Пробиотик «Лакто-бактерин сухой»	<i>L. plantarum</i> 8p-a3		1	3	-	0,5	1	2	2	2
Микробиота кишечника здоровых добровольцев	<i>L. salivarius</i> A5-1-10	-		1	-	-	-	0,5	-	-
	<i>L. salivarius</i> A7-1-15	-	-		-	-	-	-	-	-
	<i>L. gasseri</i> A4-2-1(12)	-	-	-		-	-	-	-	-
	<i>L. gasseri</i> A15-1-8	-	-	-	1		-	-	-	-
Микробиота кишечника пациентов с БК	<i>L. salivarius</i> 144/2021-8	-	-	2	-	-		1	-	-
	<i>L. salivarius</i> 198 vzk — 4	-	-	1	-	-	-		-	-
	<i>L. gasseri</i> 100/2021-13	-	-	1	-	-	0,5	-		-
	<i>L. salivarius</i> 098/2021-6	-	-	1	-	-	0,5	2	-	

\* Работа выполнена на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № 0671-2020-0058).

© Л. Х. Хуснуллина, Д. Р. Хуснутдинова, А. М. Харченко, М. Н. Синягина, М. И. Маркелова, С. Р. Абдулхаков, Т. В. Григорьева, 2022

Таким образом, повышенная представленность *L. salivarius* и *L. gasseri* в микробиоте кишечника пациентов с БК обусловлена увеличенной антагонистической активностью по сравнению со штаммами от здоровых добровольцев, которая может быть результатом высокой кислотообразующей активности.

#### **Литература**

1. Ghosh T. S., Arnoux J., O'Toole P.W. Metagenomic analysis reveals distinct patterns of gut lactobacillus prevalence, abundance, and geographical variation in health and disease // Gut Microbes. 2020. Т. 12, № 1. С. 1822729.

## ОСОБЕННОСТИ РОСТА *BACILLUS* SPP. НА ОРГАНОМИНЕРАЛЬНОМ СУБСТРАТЕ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ\*

Н. А. Чечкова

Петрозаводский государственный университет

✉ tche4kova.natalia@yandex.ru

### Аннотация

Изучена возможность использования для культивирования бактерий рода *Bacillus* spp. донных отложений как специфического органоминерального субстрата, источника органических форм азота, фосфора, макро- и микроэлементов. Параметры роста бацилл оценивали с помощью биореактора «RTS-1С, Biosan», для этого регистрировали значения оптической плотности культурального раствора и удельной скорости роста. В результате применения донных отложений в качестве субстрата к 31-му ч культивирования достигнуто увеличение оптической плотности до 3,47 единиц, а удельной скорости роста — до 0,17 h<sup>-1</sup>.

Среди широкого спектра параметров для оценки биотехнологического потенциала микроорганизмов используют кинетические характеристики как показатели физиологической активности микроорганизмов, связанной с достижением максимальных значений оптической плотности или концентрации микробных клеток и скорости роста. В качестве органоминерального субстрата для культивирования *Bacillus* spp. применен модуль, состоящий из донных отложений и питательной среды. Бациллы выделены из природных мест обитания и идентифицированы до рода по фенотипическим признакам, регламентированным в справочнике «Определители бактерий Берджи» (1997). Донные отложения получены в результате мелиорации рыбохозяйственных водоемов Карелии и использованы как источник органических форм азота и фосфора, макро- и микроэлементов (K, Ca, Mg, Fe, S, Na). Аппаратурное обеспечение процесса культивирования *Bacillus* spp. выполнено с помощью биореактора Reverse-Spin (RST). В нем система контроля и управления автоматизирована за счет программного обеспечения *Grant Instruments "Labvise"*, которое позволило задавать оптимальные параметры для культивирования, регистрировать и записывать исследуемые кинетические параметры (скорость перемешивания, температура процесса, оптическая плотность и скорость роста). В качестве основных режимов культивирования *Bacillus* spp. выбраны кислородный и температурный режимы и кислотность. Кислородный режим подобран исходя из типа дыхания *Bacillus* spp. (факультативные анаэробы), температурный — по экологическим особенностям мезофилов с температурным оптимумом для роста в пределах от 20 до 40 °С. Кислотный режим подобран исходя из биохимической активности микробов и направленности, осуществляемых ими биохимических превращений, установленных согласно проанализированным литературным источникам. Для *Bacillus* spp. минимальными значениями кислотности считаются рН в диапазоне значений 6,8.

Физиологическая активность *Bacillus* spp. на органоминеральном субстрате из донных отложений исследована в течение 48 ч эксперимента. На основании анализа полученных в результате культивирования данных установлено, что рост исследуемых штаммов подчиняется закономерностям, описанным для микробных культур в процессе периодической ферментации, и выражается последовательностью 5 фаз клеточного роста: 1 — лаг-фаза; 2 — короткая промежуточная фаза I; 3 — экспоненциальная фаза; 4 — промежуточная фаза II; 5 — стационарная фаза. Адаптация микроорганизма к условиям культивирования длилась 9 ч, фаза экспоненциального роста — 13 ч, фаза стационарного роста, или «плато», — 27 ч. Максимальные значения оптической плотности культурального раствора зарегистрированы к 31-му ч эксперимента и соответствовали 3,47 единицам оптической плотности и показателям удельной скорости роста — 0,17 h<sup>-1</sup>. Полученные результаты имеют большое значение для использования альтернативных, доступных и дешевых субстратов в процессе культивирования биотехнологически значимых штаммов микроорганизмов.

\* Работа выполнена при поддержке гранта Главы Республики Карелия на 2022 год, проект №. КГРК-21/Н3-12.  
© Н. А. Чечкова, 2022

## ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЦР\*

А. С. Чубаров, И. П. Оскорбин, М. Л. Филипенко, Д. В. Пышный

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

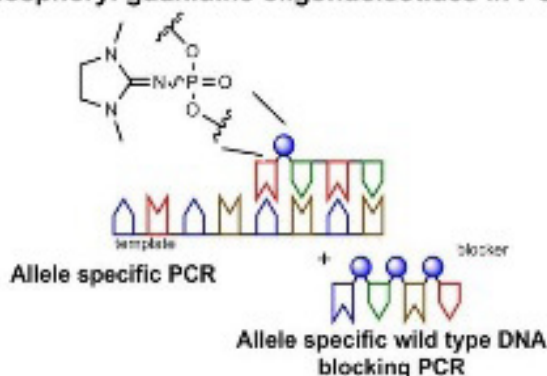
✉ chubarovalesha@mail.ru

### Аннотация

Аллель-специфическая ПЦР — широко используемый метод обнаружения соматических мутаций. Чтобы улучшить чувствительность и специфичность распознавания мутаций *KRAS*, в настоящей работе предлагается новый тип модификаций олигонуклеотидов — олигонуклеотиды с фосфорилгуанидиновой модификацией в межнуклеотидном фосфате. Метод позволяет определять 0,1 % мутаций *KRAS* на уровне 20 копий мутантной ДНК с хорошей специфичностью.

Синтетические олигонуклеотиды в настоящее время нашли широкое применение в ПЦР-диагностике. В ИХБФМ СО РАН разработан новый класс олигонуклеотидов — фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО). ФГ-модификация представляет собой незаряженный органический остаток в межнуклеотидном фосфодиэфирном фрагменте. Присутствие такого остатка в тесном сайте взаимодействия ДНК/фермента влияет на эффективность и селективность ферментативной реакции. Показано, что включение одной ФГ-модификации в праймеры приводит к идентификации одиночных мутаций с помощью метода аллель-специфичной ПЦР с хорошей специфичностью и чувствительностью на фоне ДНК дикого типа для обнаружения мутаций *KRAS* (G12V, G12A, G12D и G13D). Продемонстрирована возможность определения 0,1 % мутации на уровне 20 копий мутантной ДНК в экспериментах на плаزمидах. Показана возможность использования праймеров, модифицированных 3 ФГ-модификациями в методе блокирующей аллель-специфичной ПЦР [1]. Применение блокара, имеющего большее сродство к ДНК дикого типа, привело к возможности детекции 0,1–0,01 % мутантной ДНК. Продемонстрировано, что в зависимости от концевой 3'-«мисматча» ФГ-модификация может служить вместо дополнительных мисматчей и повышать специфичность определения мутации.

### phosphoryl guanidine oligonucleotides in PCR



Фосфорилгуанидиниевая модификация праймеров в методе ПЦР

### Литература

1. Chubarov A. S., Oscorbin I. P., Filipenko M. L. et al. Allele-Specific PCR for *KRAS* Mutation Detection Using Phosphoryl Guanidine Modified Primers // *Diagnostics*. 2020. Vol. 10. P. 872.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-24-00996).  
© А. С. Чубаров, И. П. Оскорбин, М. Л. Филипенко, Д. В. Пышный, 2022



## ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗА ИЗ *TRYPANOSOMA CRUZI* — НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ШАГАСА\*

А. А. Чудин, Е. В. Кудряшова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

✉ andrew\_18@inbox.ru

### Аннотация

Галактонолактонооксидаза (ЕС 1.3.3.12) из паразитического организма *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) катализирует конечную стадию биосинтеза витамина С, который является природным антиоксидантом. Поскольку *T. cruzi* не может поглощать витамин С из окружающей среды, паразит полагается на синтез *de novo* для своего выживания. В организме человека галактонолактонооксидаза отсутствует, поэтому ингибирование TcGAL можно рассматривать как возможное селективное лечение болезни Шагаса, вызванной *T. cruzi* [1]. Однако TcGAL — малоизученный фермент вследствие своих мембранных свойств (не функционирует в водной среде), и, как следствие, эффективный ингибитор данного фермента до сих пор не найден.

Для разработки метода определения активности TcGAL использован мицеллярный подход (система обращенных мицелл, а именно, 0,1 М АОТ в *n*-октане), который в настоящее время является единственным способом измерения активности этого водонерастворимого мембранного фермента. Разработанный метод применен для анализа части потенциальных ингибиторов TcGAL: ряда хальконов и аллилбензолов (включая апиол и его структурные аналоги) для выяснения роли некоторых структурных фрагментов в ингибировании.

Установлено, что апиол, аллилбензол и их аналоги — эффективные ингибиторы TcGAL, проявляющие ингибирующий эффект при концентрациях IC<sub>50</sub> = 10–70 мкМ. Хальконы, напротив, оказывают слабое влияние на активность TcGAL (25%-е ингибирование при концентрации 300–500 мкМ). Известно, что некоторые из соединений ряда апиолов и аллилбензолов проявляют себя как ингибиторы роста *T. cruzi* (например, изомер аллилбензола — 1-фенилпроп-1-ен), однако механизм их действия остается неясным. В рамках данной работы предполагается, что мишень таких ингибиторов — фермент TcGAL. Таким образом, в настоящей работе установлено, что ряд аллилбензолов, апиола и их аналогов являются ингибиторами TcGAL, и они могут рассматриваться как перспективная основа для лекарств против болезни Шагаса.

### Литература

1. Chudin A. A., Kudryashova E. V. Improved Enzymatic Assay and Inhibition Analysis of Redox Membranotropic Enzymes, AtGALDH and TcGAL, Using a Reversed Micellar System // *Analytica*. 2022. Vol. 3, is. 1. P. 36–53.

\* Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-спектрометр Фурье Bruker Tensor 27 (Германия) и КД-спектрометр Jasco J-815 (Япония)) по программе развития МГУ.

© А. А. Чудин, Е. В. Кудряшова, 2022

## ОПТИЧЕСКАЯ БИОСЕНСОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ТИТАНА ДЛЯ МОНИТОРИНГА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ МОЛОКА\*

Д. О. Шавронская, Е. А. Назарова

*Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург*

✉ shavronskaya@scamt-itmo.ru

### Аннотация

Разработана оптическая сенсорная система на основе наноразмерного  $\text{TiO}_2$  с применением ферментативных реакций для рутинных лабораторных измерений содержания пероксида водорода, крахмала и лактозы в молоке. Изучены и определены аналитические характеристики предлагаемой тест-системы: линейные диапазоны измерения, пределы обнаружения, время отклика, воспроизводимость, селективность и стабильность.

Молоко и молочные продукты обладают высокой пищевой и биологической ценностью. Мониторинг их качества и обеспечение безопасности — важная составляющая технологического процесса производства данных продуктов [1].

В настоящий момент наиболее распространенными методами определения качества и безопасности молока являются исследования в оборудованных лабораториях на предприятиях. Однако потребность в сложных аппаратах, обученном персонале и дорогих реагентах, а также значительные затраты временных ресурсов и необходимость предварительной подготовки образцов ограничивает эффективность их применения при быстром поточном производстве [2]. В последние годы наблюдается тенденция повышенного спроса на новые экспресс-методы анализа качества пищевых продуктов [3].

В данной работе описан количественный экспресс-метод обнаружения пероксида водорода, крахмала и лактозы в молоке, основанный на пероксидазноподобной активности диоксида титана. Перекись водорода, находящаяся в образце или образующаяся в результате ферментативных реакций, взаимодействует с  $\text{TiO}_2$  с появлением желтоокрашенного пероксокомплекса диоксида титана [4].

Золь диоксида титана синтезирован золь-гель методом в соответствии с описанной ранее методикой [5] и подвергнут диализу для повышения до оптимального значения  $\text{pH} = 4,5$ . Далее эта матрица использовалась для энтрапирования ферментов: глюкоамилазы и глюкозооксидазы — для обнаружения крахмала, бета-галактозидазы и глюкозооксидазы — для определения лактозы. Кроме того, исследованы физико-химические свойства золя  $\text{TiO}_2$  и биокompозита: определены размер частиц диоксида титана, дзета-потенциал, фазовый состав, рассчитаны размер кристаллита, удельная площадь поверхности и размер пор.

Оптический отклик тестовых зон биосенсорной системы на присутствие аналитов в образцах молока измерен методом оптической спектроскопии в режиме диффузного отражения. Проявление окрашивания тестовой зоны на пероксид водорода начинается мгновенно, оптимальное время отклика биосенсоров на крахмал или лактозу — 25 мин. Продемонстрированы высокая воспроизводимость оптического сигнала, селективность биосенсорной системы к другим моно- и дисахаридам, сохранение активности биоселективного элемента при холодильном хранении в течение 50 дней.

Для возможности практического применения сенсора в настоящее время разрабатывается портативное фотометрическое устройство на базе платформы Arduino для количественного анализа лактозы и фальсифицирующих веществ. Аппаратное обеспечение устройства включает в себя диод, излучение которого отражается от сенсорной зоны и попадает на датчик интенсивности света. Далее сигнал передается на микроконтроллер, где обрабатывается и выводится на дисплей устройства. Простота использования разработанной биосенсорной системы прокладывает путь к ее внедрению в повседневную лабораторную практику на молочных заводах России.

### Литература

1. Suh J. H. Critical review: Metabolomics in dairy science — Evaluation of milk and milk product quality // Food Res. Int. 2022. Vol. 154.
2. Ray R., Prabhu A., Prasad D. Paper-based microfluidic devices for food adulterants: Cost-effective technological monitoring systems // Food Chem. 2022. Vol. 390.
3. Yang T., Duncan T. V. Challenges and potential solutions for nanosensors intended for use with foods // Nat. Nanotechnology. 2021. Vol. 16 (3). P. 251–265.
4. Eisenberg G. M. Colorimetric Determination of Hydrogen Peroxide // Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1943. Vol. 15 (5). P. 327–328.
5. Yakovlev A. V., Milichko V. A., Vinogradov V. V., Vinogradov A. V. Inkjet Color Printing by Interference Nanostructures // ACS Nano. 2016. Vol. 10 (3). P. 3078–3086.

\* Работа выполнена в рамках научного проекта № 21-76-00034 при финансовой поддержке Российского научного фонда.  
© Д. О. Шавронская, Е. А. Назарова, 2022

**ВЫДЕЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ АНТОГОНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ *BIFIDOBACTERIUM* SPP.**

З. О. Шарипова<sup>1</sup>, Х. О. Джуманазарова<sup>2</sup>, Я. С. Зияев<sup>1</sup>, Б. Р. Умаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ташкентский научно-исследовательский институт вакцины и сывороток

<sup>2</sup>Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека, Ташкент

✉ b.r.umarov@mail.ru

**Аннотация**

В статье представлены данные по выделению и изучению микроорганизмов *Bifidobacterium* spp. из фекалий младенца первых дней жизни. Из желудочно-кишечного тракта младенца выделено 4 отдельных изолята, изучены культурально-морфологические, биохимические и антогонические свойства.

**Введение**

Бифидобактерии — один из основных бактерий-симбионтов кишечника человека. У новорожденных детей они составляют до 80 % от всех бактерий, а их доля в микробиоте взрослых людей достигает 34 %. Бифидобактерии играют важную роль в стимулировании работы иммунной системы организма, вырабатывают антибактериальные вещества, предотвращают прикрепление патогенных микробов к стенке кишечника, синтезируют витамины и участвуют в пищеварении за счет способности расщеплять сложные пищевые углеводы, которые не могут быть усвоены организмом [1].

Цель данных работ — выделить новые штаммы *Bifidobacterium* spp. из фекалий младенца.

**Материал и методы**

Из фекалий младенцев первых дней жизни выделили факультативно-анаэробные и аэробные бактерии на питательной среде: МРС — лактоагар [2]. Культивирование проводилось при 37 °С в течение 2 суток. На данной питательной среде отбирали изолированные колонии, характерные для бифидобактерий. Для изучения биохимических свойств использовали раствор углевода в концентрации 10 %, культивирование происходило при 37 °С в течение 4 суток [3]. Антагонистическая активность консорциума штаммов бифидобактерий изучена методом *in vitro* при совместном выращивании с патогенными тест-штаммами по зоне задержки роста тест-микробов методом штриховых кодов [4].

**Результаты исследования**

Результаты исследования показали в организме новорожденных, что микроорганизмы распределены равномерно в зависимости от занимаемого биотопа: пищеварительный тракт, дыхательные пути, кожа, мочеполовая система. Наиболее изученным и многочисленным по видовому спектру и количеству микробиоты является ЖКТ, нормальное функционирование которого напрямую влияет на будущее здоровье младенца. На состав кишечного микробиома ЖКТ новорожденного оказывают влияние различные факторы. Выделенные 4 изолята из 7-дневных младенцев идентифицированы в соответствии с определителем бактерий Берджи [5]. Изученные бифидобактерии обладали высокой антагонистической активностью ко всем тестовым штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий. В связи с актуальностью направления из этих штаммов создан новый микробный консорциум микроорганизмов.

Полученные экспериментальные данные показали, что антагонистическая активность микробного консорциума по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям, а также его устойчивость к антибиотикам значительно выше. Созданная биологически активная добавка на основе консорциума бифидобактерий может применяться для профилактики различных желудочно-кишечных заболеваний, так как ее задача — восстановить в организме полезную микрофлору и жизненно важные вещества для обеспечения нормального функционирования ЖКТ, предупреждать первопричины множества заболеваний.

**Литература**

1. Свои микробы ближе к телу. URL: [https://www.gazeta.ru/science/2015/11/05\\_a\\_7869035.shtml](https://www.gazeta.ru/science/2015/11/05_a_7869035.shtml)
2. 110660 MRS agar — Питательная среда — МРС агар. URL: <http://www.mibio.ru/contents.php?id=685>
3. Никитин В. М. Справочник методов биохимической экспресс-индикации микробов. Кишинев, 1986. 294 с.
4. Червинец Ю. В., Червинец В. М., Самоукина А. М., Михайлова Е. С. Антагонистическая активность пробиотических штаммов // Успехи современного естествознания. 2009. № 2. С. 73–75.
5. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи. М., 1997. С. 58.

## ПОЛУЧЕНИЕ КРИОГЕЛЕЙ ИЗ ТЕХНИЧЕСКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ И КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ\*

А. Р. Шевченко<sup>1,2</sup>, А. С. Аксенов<sup>1,2</sup>, К. А. Майорова<sup>1</sup>, М. А. Родичева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Северный (Арктический) федеральный университет им. М. В. Ломоносова, Архангельск

<sup>2</sup>ФИЦ комплексного изучения Арктики им. Н. П. Лаверова УрО РАН, Архангельск

✉ schewchenko.aleks@yandex.ru

### Аннотация

Тенденция к разработке новых продуктов из возобновляемого растительного сырья, в частности аэрогелей и криогелей, сочетается с принципами биоэкономики и переработки природных ресурсов. Полисахаридные биоаэрогели и криогели обладают особенностями, аналогичными синтетическим полимерам и неорганическим аэрогелям, которые имеют теплоизолирующие свойства, а также используются как абсорбенты при биоремедиации и изоляционные материалы. В данной работе предложен способ обработки технической целлюлозы биокатализаторами на основе гриба *P. verruculosum* с дальнейшим кислотным воздействием на полученную модифицированную целлюлозу концентрированной ортофосфорной кислотой с последующим получением криогеля.

Особый практический интерес к разработке и использованию комплекса природных полисахаридов в биоэкономике связан с возможным истощением ископаемых ресурсов в совокупности с экологическими проблемами. Из возобновляемого растительного сырья выделяется древесное, так как высокое содержание полисахаридов в древесной массе, сопоставимое с зерном, предлагает большие перспективы в рамках комплексного подхода переработки. В России потенциальным источником целлюлозных субстратов в первую очередь рассматривается побочная продукция растениеводства и деревопереработки.

Создание устойчивой биоэкономики возможно только при использовании высокоэффективных способов конверсии. Для достижения глубокой и контролируемой биоконверсии растительного сырья решающее значение имеет выбор эффективных углеводно-активных ферментов, которые включают целый комплекс гликозил-гидролаз с различным механизмом разрушения макромолекул. Контролируемая конверсия необходима для достижения заданных свойств как гидролизата углеводов, так и негидролизованного остатка, бимодифицированной целлюлозы.

Ресурсосберегающие технологии биоэкономики ориентированы на получение биовеществ в естественном цикле растительного сырья, в котором нет отходов, а продукты образуются на разных его этапах. В настоящее время исследователи сосредотачиваются на получении биоаэрогелей и криогелей в рамках биоэкономики из возобновляемого сырья. Одним из подобных решений могут служить полисахаридные гели, биоаэрогели/криогели, которые представляют собой сухие, сверхлегкие пористые материалы с высокой удельной поверхностью.

В качестве субстратов биокаталитической конверсии выступали промышленные образцы технической бленной целлюлозы лиственных пород, полученной из смеси осины и березы на Архангельском целлюлозно-бумажном комбинате. В работе применялись ферментные препараты, продуцируемые рекомбинантными штаммами *Penicillium verruculosum*. Комплекс ферментов в основном содержал эндоглюканазы, целлобиогидролазы, ксиланазы и целлобиазы [1].

Ферментативный гидролиз проводили с использованием лабораторного биореактора *Biostat A Plus* (*Sartorius*). Концентрация субстрата 10 %, температура 50 °С при постоянном перемешивании (300 об/мин), pH 5,0. Бимодифицированную целлюлозу промывали и лиофильно высушивали на *Labconco FreeZone 2,5*. После 5 ч конверсии кристалличность модифицированной целлюлозы увеличилась на 4,5 % (см. рисунок, Б), а степень полимеризации снизилась в 2,7 раза, что свидетельствует о существенной модификации исходного целлюлозосодержащего сырья (см. рисунок, А).

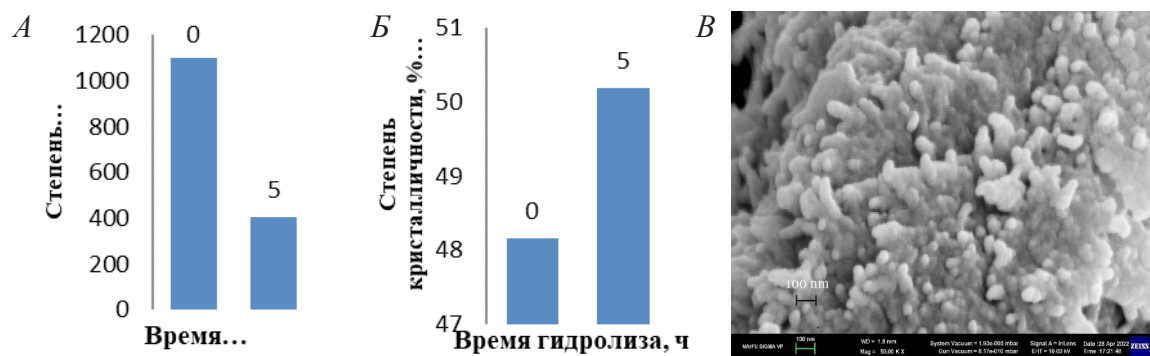
Криогели получали после 5-часового ферментативного гидролиза. Концентрация бимодифицированной сульфатной целлюлозы составляла 5 %, а в качестве растворителя использовалась 85%-я фосфорная кислота ( $H_3PO_4$ ). Время растворения 25 ч при температуре 22–24 °С. В качестве осадителя модифицированной целлюлозы из раствора фосфорной кислоты применяли дистиллированную воду. Регенерированную целлюлозу промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции с фенолфталеином [2]. После всех манипуляций полученный гель замораживали и подвергали сублимационной сушке.

В результате апробирована двухэтапная работа по получению криогелей из бимодифицированной целлюлозы с использованием концентрированной ортофосфорной кислоты в качестве растворителя. Средний выход

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-24-20136).

© А. Р. Шевченко, А. С. Аксенов, К. А. Майорова, М. А. Родичева, 2022

криогеля составляет 70 % от исходной модифицированной целлюлозы, с высокой пористостью  $\approx 96$  % и низкой плотностью  $\approx 0,06$ .



*A* — изменение степени полимеризации технической белой лиственной целлюлозы за первые 5 ч ферментативной конверсии; *B* — зависимость степени кристалличности от времени гидролиза; *B* — СЭМ-изображение криогеля из ферментативно-модифицированной целлюлозы

### Литература

1. Shevchenko A. et al. Products of Hydrolysis of Bleached Hardwood Kraft Pulp by Carbohydrate-Active Enzymes // Int. Conf. Adv. Emerging Trends Technol. Springer, 2022. P. 114–123.
2. Tyshkunova I. V. et al. Cellulose cryogels prepared by regeneration from phosphoric acid solutions // Cellulose. 2021. T. 28, № 8. С. 4975–4989.

## ОЦЕНКА СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА *STREPTOMYCES*\*

В. Н. Шелковникова, М. Е. Дмитриева, Е. В. Переляева, А. Ю. Бельшенко, Д. В. Аксёнов-Грибанов

Иркутский государственный университет

✉ shelkovnikova551@gmail.com

### Аннотация

Микроорганизмам, обитающим в экстремальных условиях среды, уделяется особое внимание, так как они способны адаптироваться к неблагоприятным условиям, поэтому растет их биотехнологический потенциал и возможность выделения биологически активных метаболитов. Это приобретает особую значимость ввиду того, что одна из главных проблем современного здравоохранения — рост смертности населения от различных заболеваний.

Цель данного исследования — оценка антимикробной активности и синтеза природных соединений термофильного штамма *Streptomyces* 019-1HS. Штамм выделен из байкальской губки *Lubomirskia baikalensis* в результате нагрева при 110 °С в течение 2 ч. Далее *Streptomyces* 019-1HS был культивирован при шести температурах (13; 28; 37; 45; 55 и 65 °С) в 11 питательных средах, различных по составу. С использованием подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии проведена оценка синтезируемых соединений штаммом *Streptomyces* при 13; 28 и 37 °С. Антимикробная активность оценена с помощью диско-диффузионного метода для всех температурных условий.

В ходе культивирования при 13 °С обнаружено 279 соединений, при 28 °С — 386, а при 37 °С — 375. При всех температурных условиях штаммом были синтезированы 87 природных соединений, в том числе противоопухолевые средства *JBIR 120*, *Nivelactam*, *Anguinomycin C* и *Usabamycin A*, противобактериальный агент *Albaflavenone*.

Исключительно при температуре 13 °С штамм синтезировал 111 соединений, большинство которых представлено антибиотиками: *Antibiotic INA 2770*, *Penicillin N*, *Megacidin*, *Antibiotic OA 6129E* и *Herbimycin B*. Также обнаружено соединение *Cyclo(leucylprolyl); (3S,8aS)-form* с противоопухолевым и противогрибковым эффектами.

Только при температуре 28 °С штамм *Streptomyces* синтезировал 158 соединений. Идентифицированные вещества представлены противогрибковыми *N-Acetylquestiomycin A* и *Butyrolactol A*, гербицидом *Herboxidiene*, ингибиторами эстеразы *Ebelactone B* и желудочной АТФазы *A 88696F*, а также нематоцид и митицид *Milbemycin B*.

При температуре 37 °С термофильный штамм *Streptomyces* синтезировал 194 соединения, которые не были обнаружены при 13 и 28 °С. Большинство идентифицированных соединений являются антибиотиками: *Antibiotic Sch 382583*, *Antibiotic FL 120B*, *Antibiotic JI 20B*, *Antibiotic GEX 1Q3* и *Antibiotic TPU 0043*; *Stereoisomer(2), 1',14-dihydroxy*. Также присутствовали фитотоксины *Thaxtomin C* и *Thaxtomin A*; *3,3''-Dideoxy*, противогрибковые агенты *Carbazomycin B* и *Venturicidin X*.

Антимикробная активность отмечена против роста *Bacillus subtilis* при 28; 37 и 45 °С, *Mycobacterium smegmatis* — при 28; 37; 45 и 55 °С. Более того, при температуре 37 °С зафиксирована антимикробная активность против роста *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* и *Candida glabrata*.

\* Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно-образовательных центрах (проект № 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал), Гранта Президента РФМК-1245.2021.1.4. и грантов Иркутского государственного университета, направленных на поддержку молодых ученых.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДУЦИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ *NICOTIANA BENTHAMIANA* ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ В РАСТЕНИИ\*

Е. В. Шешукова<sup>1</sup>, Ф. А. Липскеров<sup>2</sup>, Т. В. Комарова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

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

✉ sheshukova@vigg.ru

### Аннотация

Контролируемую продукцию целевого белка можно получить с помощью вектора, содержащего индуцируемый промотор. Предложена система, основанная на использовании промоторов генов растений для накопления в листьях *Nicotiana benthamiana* рекомбинантного терапевтического антитела в виде единого полипротеина, процессируемого в клетке до отдельных субъединиц с последующей сборкой полноразмерного иммуноглобулина *in planta*.

Возможность продукции мультисубъединичных рекомбинантных белков млекопитающих в клетках растений получила широкое экспериментальное подтверждение в последние годы [1].

В данной работе создана система, основанная на использовании экспрессионных векторов, включающих последовательности индуцируемых промоторов Pr<sup>γThio</sup> [2] и Pr<sup>KPILP</sup> [3] генов *γ-тионина* и *KPILP Nicotiana benthamiana* соответственно. Как продемонстрировано ранее, Pr<sup>γThio</sup> активируется в ответ на повышенную продукцию чужеродного белка, содержащего сигнал ядерной локализации (NLS) [2], а Pr<sup>KPILP</sup> — в ответ на продолжительную инкубацию растения в темноте [3]. Это показано на примере репортерного гена *uidA*, кодирующего GUS. С помощью сконструированных векторов получена продукция модельного мультисубъединичного целевого белка, представляющего иммуноглобулин G1, идентичный по аминокислотной последовательности терапевтическому антителу трастузумабу [4], в листьях *N. benthamiana*. Для корректной сборки антитела необходим одновременный синтез тяжелой (ТЦ) и легкой цепей (ЛЦ) в одной и той же клетке. Для достижения эквимольного соотношения ТЦ и ЛЦ сконструированы векторы, содержащие Pr<sup>γThio</sup> или Pr<sup>KPILP</sup> и кодирующие полипротеин ЛЦ:л:ТЦ, состоящий из последовательности ЛЦ и ТЦ, слитых через линкер (л), выщепляемый эндогенной протеазой растений [5]. В результате создано два экспрессионных вектора: Pr<sup>γThio</sup>-ЛЦ:л:ТЦ и Pr<sup>KPILP</sup>-ЛЦ:л:ТЦ. Также в нашем распоряжении была контрольная плаزمиды 35S-ЛЦ:л:ТЦ, содержащая промотор 35S РНК-вируса мозаики цветной капусты. Доставка генетического материала в клетки растений осуществлялась с помощью введения суспензии *Agrobacterium tumefaciens*, содержащих одну из плазмид, в листья. При сравнении эффективности продукции антител в растении оказалось, что как Pr<sup>γThio</sup>, так и Pr<sup>KPILP</sup> обеспечивают продукцию собранных антител вдвое менее эффективно, чем 35S-промотор. Однако при выдерживании растений в темноте уровень мРНК, синтез которой направляется Pr<sup>KPILP</sup>, возрастает в 2–2,3 раза. Что касается Pr<sup>γThio</sup>, то при совместной экспрессии Pr<sup>γThio</sup>-ЛЦ:л:ТЦ и 35S-GFP-NLS выход антител увеличивается в 2,5 раза, т. е. индуцируемый в присутствии NLS-содержащих белков Pr<sup>γThio</sup> позволяет достичь уровня продукции, превосходящего уровень, обеспечиваемый наиболее часто применяемым для биотехнологических целей 35S-промотором. Таким образом, использование промоторов с ограниченной активностью в сочетании с факторами их индукции представляется перспективным инструментом для синтеза рекомбинантных белков в растениях.

### Литература

1. Shanmugaraj B., Bulaon C. J. I., Phoolcharoen W. Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production // *Plants*. 2020. Vol. 9 (7).
2. Sheshukova E. et al. *Nicotiana benthamiana* gamma-Thionin Synthesis Is Induced in Response to Foreign Nucleus-Targeted Proteins // *Biol. Life Sci. Forum*. 2022. Vol. 11, № 1.
3. Sheshukova E. V. et al. The expression of matryoshka gene encoding a homologue of Kunitz peptidase inhibitor is regulated both at the level of transcription and translation // *Biochemistry (Moscow)*. 2018. Vol. 83, № 10. P. 1255–1262.
4. Komarova T. V. et al. Plant-Made Trastuzumab (Herceptin) Inhibits HER2/Neu+ Cell Proliferation and Retards Tumor Growth // *PLOS ONE*. 2011. Vol. 6, № 3. P. e17541.
5. Jiang L., Rogers J. C. Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells // *Plant J.: For Cell Mol. Biol.* 1999. Vol. 18, № 1. P. 23–32.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ МК-3828.2022.1.4.  
© Е. В. Шешукова, Ф. А. Липскеров, Т. В. Комарова, 2022

## ФОТОХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АЛЮМИНИЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ В ТЕХНОЛОГИИ ДНК-БИОЧИПОВ\*

И. Ю. Шишкин, Р. А. Мифтахов, А. В. Чудинов

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

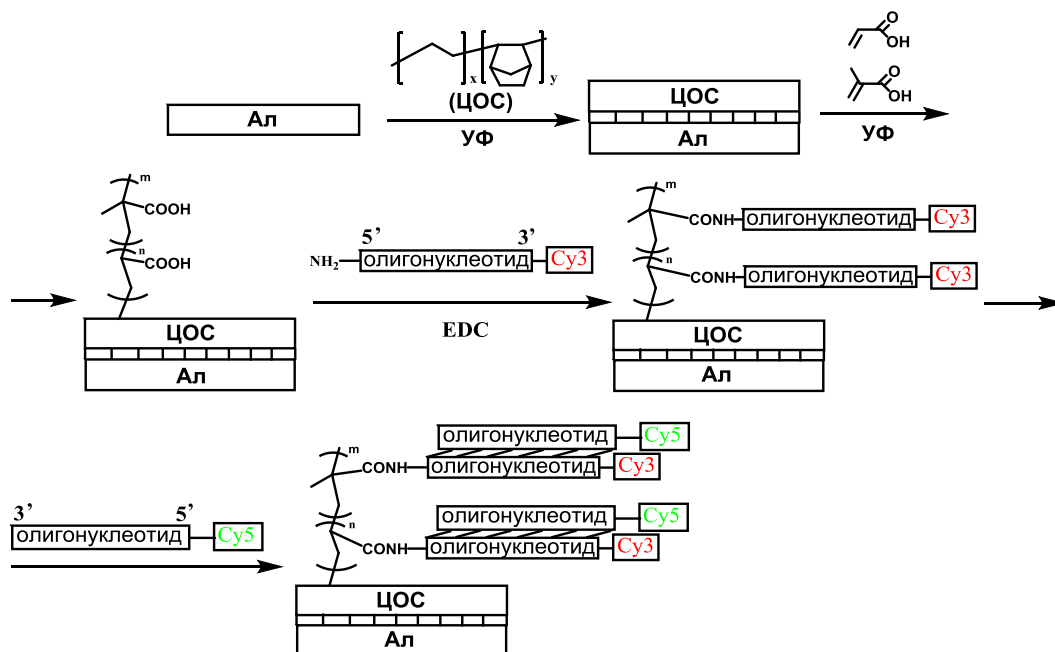
✉ shishkin.iv2017@yandex.ru

### Аннотация

Проведено ковалентное связывание алюминиевой поверхности (Ал) с циклоолефиновым сополимером (ЦОС) под действием УФ-излучения. Методом УФ-инициируемой радикальной полимеризации получены «полимерные щетки» и иммобилизованы флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды. Доступность ДНК-зондов оценена гибридным анализом.

В технологии ДНК-биочипов используют различные материалы, однако их выбор зависит от предполагаемого применения. Например, у стеклянных поверхностей важна оптическая прозрачность и низкое значение автофлуоресценции. Для иммобилизации белков и в гибридном анализе ДНК часто используют полимерные поверхности: полипропилен, полиметилметакрилат и ЦОС. Проведение ПЦР на биочипе требует периодического нагревания и охлаждения образца, поэтому необходимо выбрать материал, который имеет высокую теплопроводность и при этом низкую стоимость. Алюминий отвечает заданному критерию, однако его прямое присутствие в ПЦР приводит к ингибированию фермента ДНК-полимеразы и сорбции компонентов ПЦР на его поверхности.

В данной работе выбран подход ковалентного связывания поверхности алюминия с ЦОС, который совместим с компонентами ПЦР. Алюминий из-за окисленной пленки не обладает достаточной реакционной способностью, поэтому проводили предварительную активацию поверхности 1%-м раствором ПАВ ultrasonol-11 (Carl Roth). Активированную поверхность алюминия покрыли 5%-м раствором ЦОС в толуоле с добавлением фотоинициатора бензофенона и затем подвергли воздействию УФ-излучения. Бензофенон при переходе в возбужденное триплетное состояние способствует отрыву атомов водорода от гидроксильных групп на поверхности алюминия и от С-Н-связей ЦОС, тем самым образуя радикалы, которые ковалентно связываются друг с другом. В результате получили химически инертную подложку из алюминия, покрытую тонким слоем ЦОС (Ал-ЦОС), не имеющую свободных функциональных групп. Для иммобилизации ДНК использовали метод УФ-инициируемой радикальной полимеризации. Сначала на Ал-ЦОС нанесли слой бензофенона в метилэтилкетоне, затем добавили раствор,



Фотохимическая модификация поверхности алюминия

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-14-00257).  
© И. Ю. Шишкин, Р. А. Мифтахов, А. В. Чудинов, 2022



содержащий мономеры акриловой и метакриловой кислот, и через фотомаску облучили УФ-лампой. На поверхности образовались радикалы, которые при добавлении мономеров участвуют в формировании полимерных цепей. В результате на гидрофобной поверхности получили гидрофильные ячейки в виде «полимерных щеток», содержащих карбоксильные группы. Образовавшиеся карбоксильные группы активировали водорастворимым 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (EDC). Активированные карбоксильные группы ковалентно связывали с модифицированными фрагментами олигонуклеотидов, содержащими аминогруппу на 5'-конце и флуоресцентную метку Cy3 на 3'-конце. Регистрацию сигналов по иммобилизованным олигонуклеотидам проводили методом флуоресцентной микроскопии. Доступность ДНК-зондов проверяли гибридным анализом с ДНК-мишенью, имеющей флуоресцентную метку Cy5 на 5'-конце.

В результате получена функциональная, теплопроводная поверхность, совместимая с компонентами полимеразной цепной реакции, что представляет значительный интерес в развитии технологии мультиплексного анализа ДНК методом твердофазной ПЦР.

## ESTABLISHMENT AND OPTIMIZATION OF A BIOPATFORM BASED ON BAIKAL SKULLCAP SUSPENSION CELL CULTURE

A. A. Shmarova

*Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University*

✉ shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

### Abstract

Baikal skullcap contains biologically active compounds with valuable pharmacological properties. Introduction of the plant into *in vitro* culture is in line with the preservation of the species and the development of herbal medicines without environmental interference. In this work we evaluated the effect of the nutrient media component composition on the cell biomass growth characteristics under controlled conditions.

Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*) is a valuable medicinal plant raw material for the pharmaceutical industry. Subterranean organs of the plant produce a rich complex of polyphenolic compounds (baicalin, vogonin, scutellarein) with antiviral, anti-inflammatory, antioxidant effects, as well as inhibiting the replication of SARS-CoV-2 virus [1–3].

Due to the extensive utilization of intact plants, however, the degradation of *S. baicalensis* phytocenoses in the natural habitat is ongoing. An alternative method of obtaining the biomass with biologically active substances (BAS) is the *in vitro* cultivation of plant cells. The advantages of the technology involve the possibility of directed synthesis regulation of active compounds without damaging the environment and the independence of biomass growth from ecological and climatic factors. Thus, it is possible to create bioplatfroms based on cell culture. The main requirements are: reproducibility in subcultures, viability of cell structures, pronounced growth characteristics and BAS production at a desired scale. Nevertheless, there is a problem of selecting the optimal cultivation conditions for a particular plant species in view of the specificity of plant cells as the objects of study.

Therefore, the obtaining of suspension culture (SC) and the selection of optimal conditions for the cultivation of Baikal skullcap as a potential system for the production of BAS is the purpose of this work.

Cultivation of SC was carried out under constant mixing on a shaking platform at a rate of  $100 \pm 5$  rpm in dark conditions at 27–28 °C and relative humidity ranging from 60–70 %.

The nutrient media were prepared according to the Murasige-Skuga prescription with the addition of hormonal supplements and growth regulators. Composition № 1 contains kinetin (0.5 ml/L) and glycine (2 ml/L), composition № 2 contains 6-benzylaminopurine (1 ml/L) and casein hydrolysate (500 mg/L).

SC of *S. baicalensis* (fig. 1) is characterized by the following features: large size of parenchyma cells, aggregation (aggregate size is in the range of 8–15 mm), high viability (75–80 %), 21-day growth cycle, and correlation between growth characteristics and weight of the added inoculum.

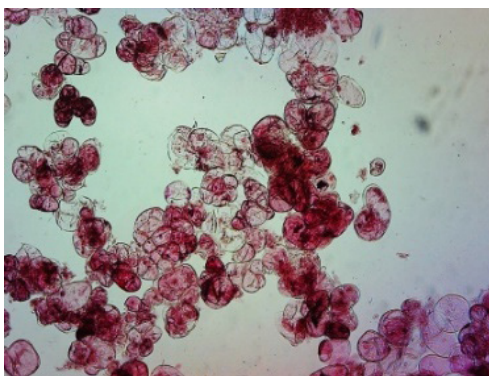


Fig. 1. Baykal skullcap cell biomass

The determination of cell viability revealed a nonspecific binding of dye molecules to the cell wall membrane. As an alternative technique, we proposed the spectrophotometric method for the identification of viable structures.

In the present study, we compared the effect of the component composition of nutrient media on the physiological and growth characteristics of suspensions (fig. 2, 3). The obtained data demonstrated that the composition substrate № 2 provides more optimal conditions for the growth and development of cell biomass.

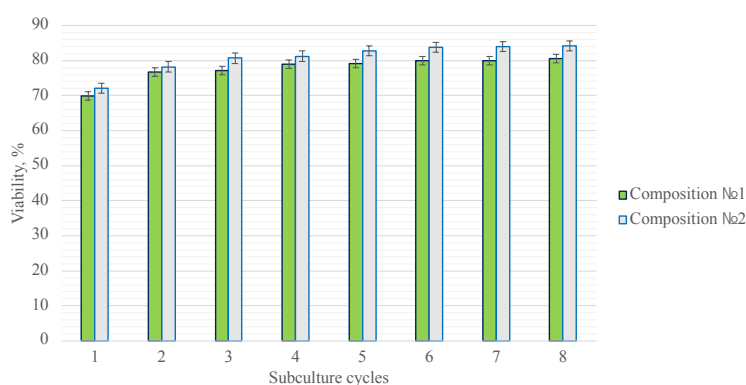


Fig. 2. Effect of the nutrient composition on changes in Baikal skullcap cell biomass viability

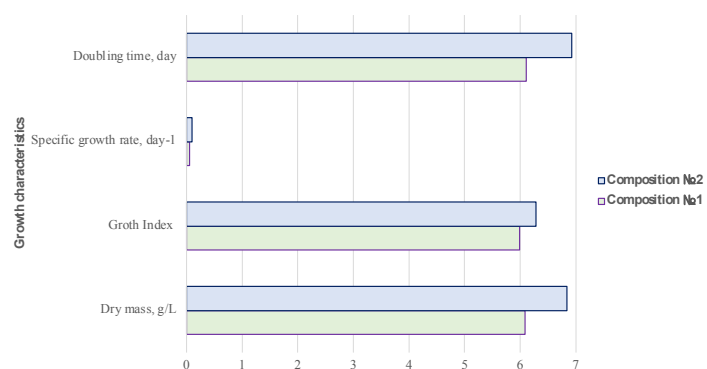


Fig. 3. Effect of the nutrient composition on changes in Baikal skullcap cell biomass growth characteristics

However, that assumption requires more detailed verification. Therefore, we continue to optimize the composition of nutrient media with the evaluation of the component content effect on biomass growth.

Of particular interest is the study of the quantitative composition of BAS and the dynamics of valuable substances accumulation. A more detailed consideration of this question is planning in the future investigations.

### References

1. Liao H. et al. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: A comprehensive review // *Biomed. Pharmacotherapy*. 2021. Vol. 133. P. 110917.
2. Xiang L. et al. Therapeutic potential of *Scutellaria baicalensis* Georgi in lung cancer therapy // *Phytomed*. 2021. P. 153727.
3. Liu H. et al. *Scutellaria baicalensis* extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro* // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 2021. Vol. 36, № 1. P. 497–503.

## КОМПОЗИЦИЯ ПЭДОТ : ПСС/ГРАФЕН ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В БИОСЕНСОРАХ И БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ

И. А. Шорохова<sup>1</sup>, С. Е. Тарасов<sup>2</sup>, Н. А. Кленова<sup>1</sup>, А. Н. Решетилов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С. П. Королева

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»

✉ impia2807@gmail.com

### Аннотация

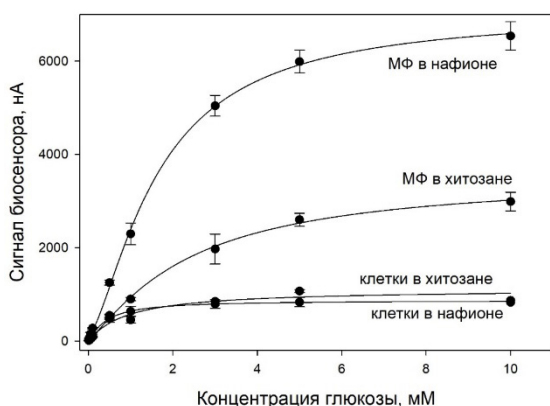
Эффективность работы биоэлектрохимических устройств напрямую зависит от используемого биокатализатора. В работе исследовали макеты биосенсоров и биотопливных элементов (БТЭ) на основе целых клеток бактерий *Gluconobacter oxydans* и фрагментов их клеточных мембран. БТЭ на основе мембранных фракций (МФ) генерировал мощность в 5,1 мкВт/см<sup>2</sup>. Кулоновская эффективность двух макетов составила 4,0 и 6,3 % для клеток и МФ соответственно.

БТЭ называют электрохимические устройства, генерирующие электрическую энергию с помощью биокаталитических реакций [1]. Биосенсоры — это электроаналитические устройства, предназначенные для определения искоемых соединений с помощью молекулярного распознавания. В качестве биокатализатора в них могут использоваться как целые бактериальные клетки (БК), так и их фрагменты, например МФ уксуснокислых бактерий, в которых ферментные комплексы сохраняются в исходном состоянии [2].

В настоящее время активно изучается возможность применения новых проводящих материалов при создании электродов: углеродных наноматериалов [3] и проводящих полимеров [4]. Одними из перспективных полимеров, которые привлекают внимание, является поли(3,4-этилендиокситиофен) — ПЭДОТ, а также поли(3,4-этилендиокситиофен) : полистеренсульфоновая кислота — ПЭДОТ : ПСС [5], которые часто используют в сочетании с наноматериалами.

Цель данной работы — изучение электрохимических характеристик БТЭ и биосенсоров, модифицированных проводящим полимерным гелем ПЭДОТ : ПСС/графен, на основе целых бактерий и их фрагментов и оценка их аналитических параметров.

В качестве рабочих электродов применили два типа графитовых электродов: трехконтактные электроды, полученные методом матричной печати (ООО «КолорЭлектроникс», Москва), а также стержни из графита спектральной чистоты (ООО «Полипроф-Л», Москва, Россия). В качестве биологических объектов использовали БК *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино, Россия) и их МФ, полученные методом ультразвуковой дезинтеграции. Концентрация биокатализаторов на поверхности электродов составила 0,36 мг/мм<sup>2</sup>. В качестве иммобилизирующих агентов применяли гели хитозана и нафтона, для улучшения проводимости системы — полимер ПЭДОТ : ПСС, модифицированный графеном (*Sigma-Aldrich*, США).



Калибровочные зависимости исследуемых электродов

Эффективность работы композиций на основе БК и МФ проверяли с помощью макетов биоэлектродов, базирующихся на графитовых печатных электродах. В качестве субстрата использовали глюкозу, так как клетки *Gluconobacter oxydans* обладают большим количеством мембранно-локализованных пирролохинолинхинон (PQQ)-зависимых глюкозодегидрогеназ. На рисунке представлены 4 композиции биоэлектродов. В таблице даны аналитические характеристики изученных композиций. Композиции на основе МФ демонстрируют высокий максимальный уровень сигнала и константу Михаэлиса. Максимальная чувствительность к глюкозе наблюдалась для биосенсоров на основе композиции с МФ, иммобилизованными в геле нафтона.

## Сравнение аналитических характеристик биосенсоров

Параметр	Композиция			
	Клетки в хитозане	МФ в хитозане	Клетки в нафине	МФ в нафине
$I_{max}$ , нА	1122	3500	882	6931
h	1,01	1,20	1,14	1,46
$K_M$ , мМ	0,90	2,30	0,42	1,63
Диапазон детекции, мМ	0,025–10	0,01–10	0,01–10	0,025–10
Линейный диапазон детекции, мМ	0,3–0,95	0,1–1,8	0,01–0,2	0,2–1,7
Уравнение линейного диапазона	$y = 354x + 187$	$y = 822x + 78$	$y = 1342x + 0,36$	$y = 2225x + 73$
Коэффициент чувствительности, нАмМ <sup>-1</sup>	354,2	822,2	1341,8	2224,0

Для оценки эффективности разработанных БТЭ сравнивали показатель генерируемой мощности макетов БТЭ на основе БК и МФ. Максимальную удельную мощность продемонстрировал макет на основе МФ, иммобилизованных в геле хитозана, — 5,1 мкВт/см<sup>2</sup>. Удельная мощность для макета на основе БК — 3,6 мкВт/см<sup>2</sup>. Кулоновская эффективность макета БТЭ на основе БК составила 4,0 %, на основе МФ — 6,3 %. Данные БТЭ и биосенсоры могут использоваться для определения концентрации и очистки сред, содержащих сахара и спирты.

## Литература

1. Алферов В. А., Василов Р. Г., Губин С. П. и др. Биотопливные элементы на основе наноуглеродных материалов // Радиоэлектроника. Наносистемы. Информ. технологии. 2014. Т. 6 (2). С. 187–208.
2. Кузнецова Е. А. Выделение, характеристика и применение мембранной фракции бактерий *Gluconobacter oxydans* // Междунар. науч.-исслед. журн. 2017. № 12-4 (66). С. 140–144.
3. Yang W., Ratinac K. R., Ringer S. P. et al. Carbon Nanomaterials in Biosensors: Should You Use Nanotubes or Graphene? // Angew. Chem. Int. Ed. 2010. Vol. 49 (12). P. 2114–2138.
4. Ramanavicius S., Ramanavicius A. Conducting Polymers in the Design of Biosensors and Biofuel Cells // Polymers (Basel). 2020. Vol. 13 (1). P. 49.
5. Решетилев А. Н., Китова А. Е., Тарасов С. Е. и др. Высокотеплопроводящий полимер ПЭДОТ : ПСС — применение в био-медицинских и биоэлектрохимических системах // Радиоэлектроника. Наносистемы. Информ. технологии. 2020. Т. 12 (4). С. 471–482.

## ФОТОХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА «ЩЕТОЧНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ» ИЗ ГЛИЦИДИЛМЕТАКРИЛАТА В ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ\*

Г. Ф. Штылев, Р. А. Мифтахов, А. В. Чудинов

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

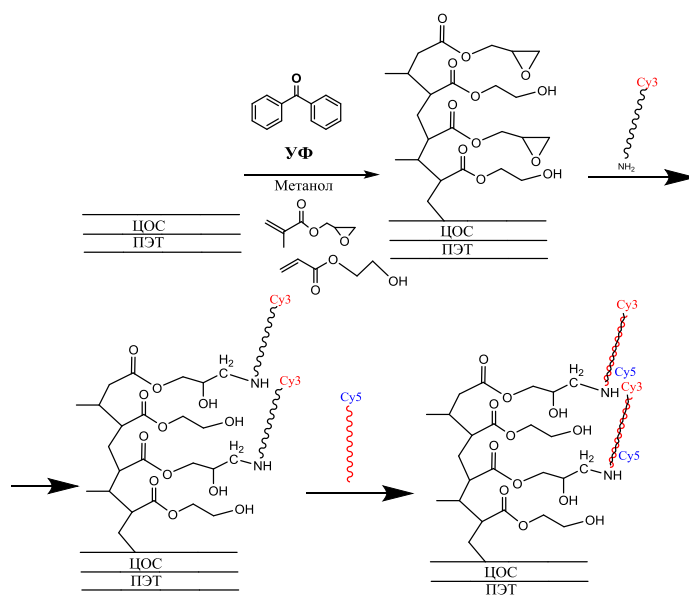
✉ gosha100799@mail.ru

### Аннотация

Изучена модификация пленок из полиэтилентерефталата (ПЭТ) методом УФ-индуцируемой полимеризации. На поверхности ПЭТ получены микроячейки из полиглицидилметакрилата для ковалентной прививки олигонуклеотидов. Иммуобилизация ДНК-зондов на поверхность ПЭТ подтверждена методом флуоресцентной микроскопии. Плотность прививки олигонуклеотидов составила 17,4 пм/см<sup>2</sup>.

Техника изготовления биочипов включает множество этапов, поэтому их сокращение и оптимизация является одним из основных направлений нашей лаборатории. Одна из стадий производства биочипов — активация карбоксильных групп «щеточных полимеров» с помощью хлорангидридов, азидов, карбодимидов или смешанных ангидридов с целью усиления электрофильности карбонильного углерода. Альтернативным подходом является получение «щеточных микроячеек» с использованием глицидилметакрилата, поскольку оксирановая группа высокорекреационноспособна при раскрытии цикла нуклеофильными агентами, что позволяет исключить стадию активации.

В данной работе в качестве подложки для биочипа применяли ПЭТ, так как он является прочным, термостойким и коммерчески доступным материалом, однако низкая реакционная способность не дает возможности добиться высокой плотности прививки «щеточных полимеров». Для функционализации поверхность ПЭТ обработали этилендиамином. На аминированную поверхность нанесли раствор циклоолефинового сополимера с бензофеноном в толуоле и облучили УФ-светом ( $\lambda = 254$  нм). В результате получили подложку из ПЭТ, покрытую тонким слоем ЦОС (ПЭТ-ЦОС). На втором этапе подложку ПЭТ-ЦОС покрыли раствором бензофенона в метилэтилкетоне, затем нанесли раствор мономеров глицидилметакрилата и 2-гидроксиэтилакрилата в метаноле и облучили УФ-светом ( $\lambda = 254$  нм) через фотомаску из кварцевого стекла. При УФ-обработке происходит радикальная полимеризация «от поверхности» с образованием микроячеек, которые состоят из «щеток» сополимера глицидилметакрилата и 2-гидроксиэтилакрилата. На третьем этапе иммобилизовали синтетические олигонуклеотиды с аминогруппой на 5'-конце и флуоресцентным красителем Cy3 на 3'-конце (см. рисунок).



Модификация поверхности ПЭТ

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 20-14-00287).  
© Г. Ф. Штылев, Р. А. Мифтахов, А. В. Чудинов, 2022

---

Иммобилизацию олигонуклеотидов подтвердили методом флуоресцентной микроскопии. Плотность ДНК-зондов составила  $17,4 \text{ пм/см}^2$ . Функциональность иммобилизованных ДНК-зондов подтверждена в гибридизационном анализе с ДНК-мишенью, содержащей флуоресцентный краситель Cy5 на 3'-конце.

Получение на поверхности ПЭТ глицидилметакрилатных «щеток» позволяет сократить стадию активации с сохранением функциональности ДНК-зондов, следовательно, данный подход может быть использован для иммобилизации биомолекул в технологии биочипов.

## РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА КОСУЛИ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS*\*

В. О. Щеголькова<sup>1</sup>, С. В. Беленькая<sup>2</sup>, Д. В. Балабова<sup>1</sup>, Д. Е. Мурашкин<sup>1</sup>, В. В. Ельчанинов<sup>3</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>3</sup>Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, Барнаул

✉ v.shhegolkova1@mail.ru

### Аннотация

Разработан рекомбинантный интеграционный вектор pSVB-Cap, позволяющий интегрировать экспрессионную кассету с геном прохимозина косули в геном дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Молокосвертывающая активность (МА) культуральной среды продуцента составила 61,8 УЕ/мл.

Для коагуляции молока в сыроделии традиционно применяется сычужный фермент (СФ). Химозин (ЕС 3.4.23.4) — гастральная аспартагная эндопептидаза, которая входит в состав СФ. Благодаря комплексу технологических параметров, обеспечивающих высокое качество сыров (повышенная МА при низкой общей протеолитической активности и умеренная термолабильность), химозин коровы считается эталонным молокозвертывающим ферментом [1]. В последние годы ведется работа по получению рекомбинантных аналогов химозина, не уступающих по совокупности технологических свойств химозину коровы. Методы генной инженерии позволяют проводить поиск молокозвертывающих протеаз среди любых видов млекопитающих, не ограничиваясь сельскохозяйственными животными. Так, исследования, посвященные изучению рекомбинантного химозина (рХн) одногорбого верблюда и альпака, показали, что рХн данных животных превосходят рХн коровы по удельной коагуляционной активности и специфичности, но уступают коровьему ферменту по термостабильности [2].

Важной составляющей создания эффективного продуцента являются подбор системы продукции. Одна из популярных платформ разработки промышленных ферментов — молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* [3].

Цель данной работы — разработка продуцента рХн косули на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis*.

Дрожжевой продуцент получали на основе ранее разработанного вектора pSVB. Ген, кодирующий прохимозин косули, синтезирован фирмой «ДНК-синтез». Последовательность клонирована в составе вектора pSVB при помощи стандартного рестриктазно-лигазного метода. Клетки *K. lactis* SVB-1 ДНК рекомбинантной плазмидой трансформировали с использованием электропоратора Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad, США) при следующих параметрах: 1500 В, 25 мкФ, 400 Ом, время 0,01 с. Перед трансформацией проводили ферментативную линейаризацию плазмиды. Трансформанты отбирали на среде YCSB. Наличие встройки экспрессионных кассет подтверждали методом ПЦР с колоний.

Для культивирования в среде YEP отобрано 24 клон. В питательную среду добавляли 4 % глюкозу и пантотенат кальция в концентрации 4,5 мг/л. По завершении культивирования проводили двухступенчатую активацию рекомбинантного прохимозина непосредственно в культуральной жидкости и определяли МА по отношению к молоку коровы. Из 24 клонов активность проявили лишь семь. Наибольшая МА зафиксирована у клона № 5 — 61,8 УЕ/мл. Клоны № 1; 2; 3 и 14 продемонстрировали активность 14,1; 15,8; 7,4 и 13,0 УЕ/мл соответственно. Клоны № 7 и 9 показали МА менее 7,0 УЕ/мл.

Таким образом, в результате проделанной работы получен продуцент рекомбинантного химозина косули.

### Литература

1. Kumar A., Grover S., Sharma J., Batish V.K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. Vol. 30, № 4. P. 243–258.
2. Kappeler S. R., van den Brink H. J., Rahbek-Nielsen H. et al. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 342, № 2. P. 647–654.
3. Spohner S. C., Schaum V., Quitmann H., Czermak P. Kluyveromyces lactis: An emerging tool in biotechnology // J. Biotechnol. 2016. Vol. 222. P. 104–116.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания (проект № FZMW-2020-0002).

© В. О. Щеголькова, С. В. Беленькая, Д. В. Балабова, Д. Е. Мурашкин, В. В. Ельчанинов, Д. Н. Щербаков, 2022



## НАНОКОНСТРУКЦИИ С ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ: ПОЛУЧЕНИЕ, АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА\*

В. А. Щелконогов<sup>1-3</sup>, А. М. Иншакова<sup>1</sup>, Е. С. Дарнотук<sup>1</sup>, А. В. Шипелова<sup>1</sup>, Н. С. Шастина<sup>1</sup>,  
О. А. Баранова<sup>2,3</sup>, А. В. Чеканов<sup>2,3</sup>, К. Д. Казаринов<sup>3</sup>, Э. Ю. Соловьева<sup>2</sup>, А. И. Федин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МИРЭА — Российский технологический университет

(Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, Москва)

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

<sup>3</sup>Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Фрязино

✉ vasilii9999@yandex.ru

### Аннотация

Получены разные наноконструкции с липоевой кислотой (ЛК) с размером частиц от 20 до 300 нм, характеризующиеся ее медленным высвобождением из наночастиц (НЧ) и высокой стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре и при  $T = +4$  °С. В наноэмульсиях (НЭ) удалось солюбилизовать ЛК в 1,5 раза выше, чем в липосомах (Лс). Обнаружено, что наночастицы с ЛК снижают степень и скорость агрегации тромбоцитов (Тц) с арахидоновой кислотой на 45–75 % и уменьшают концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Цереброваскулярные заболевания — наиболее распространенные формы патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов [1]. К основным патогенетическим механизмам развития инсульта относят возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов и др. [2]. Поэтому при комплексной терапии данной патологии необходимо применять препараты, проявляющие антиоксидантное и антиагрегантное действие. Одним из наиболее перспективных антиоксидантов является липоевая кислота. Однако она малорастворима в воде и, попадая в организм, сразу связывается с белками, биodeградирует, быстро выводится из организма, что приводит к уменьшению терапевтического действия.

**Цель работы** — получение различных наноконструкций с ЛК для ее солюбилизации в водных растворах пролонгированного высвобождения, а также исследование их влияния на функциональную активность Тц.

Вначале получали наноконструкции с ЛК (липосомы и наноэмульсии): Лс ФХ ЛК — пассивной загрузкой, диспергируя липидную пленку фосфатным буферным раствором (ФБР, рН 7,4) с последующей экструзией; прямые НЭ с ЛК — методом ультразвукового диспергирования после инъекции ФБР и стабилизаторов, в органическую фазу, содержащую ЛК и ФХ. Затем удаляли органический растворитель и избыток воды при пониженном давлении.

Таким образом, получены фосфатидилхолиновые липосомы с ЛК и наноэмульсии с ЛК на основе ФХ, олигоглицерина (ОГ) и плороника Ф68, в ФБР (рН 7,4; 0,15 мМ) с размером частиц от 20 до 310 нм. НЧ с ЛК на основе Ф68 и ОГ были гетерогенными и состояли из двух фракций НЧ: 20–70 нм ( $25 \pm 5$  %) и 110–310 нм ( $75 \pm 5$  %). Показано, что НЧ с ЛК стабильны при длительном хранении ( $> 36$  мес.) при комнатной температуре и при  $+4$  °С. Наноконструкции электронейтральны.

При сравнении характеристик полученных наноконструкций с ЛК показано, что в НЭ удалось солюбилизовать ЛК в 1,5 раза выше, используя максимальную концентрацию ЛК 8 мг/мл, в то время как для получения липосом с ЛК взяты концентрации 1 и 5 мг/мл. При дальнейшем повышении количества ЛК в липосомах образовывались нестабильные дисперсии.

Методом крио-ПЭМ обнаружено, что Лс ФХ представляют с собой гомогенную систему, состоящую из однослойных везикул сферической формы частиц, а НЭ — систему, включающую однослойные и мультислойные наноструктуры разного размера.

Далее изучали кинетику высвобождения ЛК из наноконструкций. Показано, что из липосом за 24 ч высвободилось  $45 \pm 3$  % ЛК, а из НЭ — не более 55 %. Такой процесс высвобождения ЛК из НЧ может обеспечить пролонгированное действие ЛК и длительное поддержание ее терапевтической концентрации в крови.

На следующем этапе работы оценивали влияние наночастиц ЛК на агрегацию Тц, в плазме крови, выделенной из крови здоровых доноров. Агрегацию Тц индуцировали арахидоновой кислотой, поскольку в результате ее действия образуются различные метаболиты, в том числе продукты ПОЛ. Показано, что Лс ЛК (1–2 мМ) снижают степень и скорость агрегации Тц на 30–45 % относительно контроля. Все типы НЭ ЛК (1–4 мМ) эффективней

\* Исследования выполнены в рамках гос. задания (№ гос. регистрации НИОКТР АААА-А19-119100390063-9) и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «Базис» (№ гранта 22-1-1-28-1).

© В. А. Щелконогов, А. М. Иншакова, Е. С. Дарнотук, А. В. Шипелова, Н. С. Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, К. Д. Казаринов, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, 2022

на 40–85 % уменьшают агрегацию Тц, обусловленную арахидоновой кислотой. Водорастворимые формы и НЧ без ЛК практически не оказывали влияния на агрегацию Тц. По-видимому, ЛК в наноконструкциях способна лучше проникать внутрь клеток за счет взаимодействия липидов с мембраной клеток или в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Антиоксидантное действие НЧ ЛК оценивали по концентрации активных форм кислорода (АФК) и тибарбиурат активных продуктов (ТБК-АП) в образцах обогащенной Тц плазмы, инкубированных с арахидоновой кислотой. Добавление всех типов НЧ с ЛК к образцам плазмы крови приводило к значительному уменьшению количества АФК (в 2–5 раз) и ТБК-АП (5–20 раз). Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали все типы НЭ с ЛК при использовании максимальной концентрации ЛК. Предполагаемым механизмом антиагрегационного действия наноконструкций с ЛК можно считать ингибирование ею процесса инициирования продуктов перекисидации липидов и АФК с помощью арахидоновой кислоты.

Таким образом, все типы нанодисперсий с липоевой кислотой являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vivo*.

### Литература

1. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. 328 с.
2. Щелконогов В. А., Дарнотук Е. С., Чеканов А. В., Баранова О. А. и др. Липосомальный препарат с карнозином и липоевой кислотой: получение, антиоксидантные и антиагрегантные свойства // Биофизика. 2021. Т. 66, № 39. С. 329–337.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИОБЛАСТОВ ЛОШАДИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЯСА *IN VITRO*\***

А. К. Юферова, И. В. Курилов, К. А. Ворона

*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

✉ allekss1982@mail.ru

**Аннотация**

Создание мышечной ткани для производства мяса *in vitro* с помощью тканевой и клеточной инженерии имеет в настоящее время большие перспективы. Описан протокол выделения первичных миобластов из скелетных мышц взрослой лошади и оценены их свойства. Изучалась возможность культивирования миобластов скелетной мышцы взрослой лошади, в том числе при помощи биореактора.

**Материалы и методы**

Биопсия мышц получена от лошади в возрасте 2,5 лет. Работа выполнена в соответствии с разрешением Этического комитета Казанского (Приволжского) федерального университета (разрешение № 3 от 5 мая 2015 г.). Также получено разрешение на операцию и забор мышечной ткани от владельца. Биопсия взята в ветеринарной клинике Казанского ипподрома ветеринарным специалистом.

Образец мышцы очищали от соединительной и жировой ткани в стерильных условиях, промывали стерильным фосфатным буфером (ПанЭко, Россия) и механически диссоциировали. Кусочки переносили в стерильные центрифужные пробирки и инкубировали в течение 1 ч на шейкере-инкубаторе в растворе трипсин-ЭДТА (ПанЭко, Россия). После этого суспензию клеток фильтровали через клеточный фильтр 40 мкм (SPL, Корея) и центрифугировали. Потом осадок промывали и ресуспендировали в культуральной среде. Затем клетки инкубировали 2 ч для отделения сателлитных клеток от фибробластов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в культуральной посуде с адгезивным дном. После чего суспензию неприкрепившихся клеток переносили в культуральную посуду, покрытую 0,1%-м желатином (ПанЭко, Россия). Выращивали клетки в среде при 37 °С с концентрацией CO<sub>2</sub> 5 %. Среду меняли через день.

Для идентификации клеточных популяций использовали антитела. Клеточную суспензию исследовали на следующие маркеры: анти-MYH ½ (SANTA CRUZ, США, sc53088), антимиогениновые (SANTA CRUZ, США, sc52903), анти-PAX7 (CUSABIO TECHNOLOGY, США, CSB-PA891015), антидесмин (SANTA CRUZ, США, sc14026) и анти-Ki67 (ABCAM, США, ab15580). Клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра (Guava 8T, Millipore, США).

Жизнеспособность клеток исследовали с применением набора аннексина V (Santa Crus, sc4252AK, США), а суспензию окрашенных клеток — с помощью проточного цитофлуориметра (Guava 8T, Millipore, США).

Формирование миотрубочек в культурах миобластов оценивали с использованием световой микроскопии. Для этого выделенные культуры клеток инкубировали до образования монослоя. После этого среду для выращивания клеточных культур меняли еженедельно.

Для масштабирования миобластов применяли два вида микроносителей: Cytodex 3 (Merck, Германия) и CultiSpher-S (Sigma, США). Культивирование клеток на микроносителях проводили в биореакторе (Syntheson, США) на ростовых средах.

**Результаты**

Выделенные клетки, полученные из биоптата мышц, имели веретенообразную форму с централизованным ядром. Они экспрессировали Ki67, миогенин, Pax7, десмин и MYH1/2 и принадлежали к популяции миобластов. Изучение жизнеспособности показало, что 0,2 ± 0,06 % клеток в популяции подвергались апоптозу.

При исследовании возможности культивирования клеток на носителях выявлено, что миобласты лошади не прикреплялись к поверхности микроносителя Cytodex 3. При культивировании на CultiSpher-S также наблюдалась низкая адгезия клеток к поверхности микроносителя и сниженная пролиферативная активность по сравнению с культивированием в монослое. Скорость роста клеточной популяции через 18 суток на CultiSpher-S составила 13 ± 2, а после 3–4 суток культивирования клеток в монослое — 20 ± 5. При культивировании на обедненной среде формирование миотрубочек происходило на 7–10-е сутки.

Согласно проведенным исследованиям, используемая методика подходит для выделения и культивирования миобластов взрослой лошади. Однако примененные в ходе исследования микроносители не подходят для масштабирования первичных лошадиных миобластов. В настоящее время проводится экспериментальная работа по оптимизации процессов масштабирования миобластов лошади.

На следующих этапах будут подобраны оптимальные микроносители и режимы для масштабирования клеток. В дальнейшем будет проведена биопечать миобластов в гидрогеле и получена 3D-модель мышечной ткани.

\* Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ SARS-CoV-2 С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ

Р. Д. Якупова, А. О. Деревянко, А. А. Славохотова, А. А. Ковпак, Ю. Ю. Ивин

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М. П. Чумакова РАН, Москва

✉ yakupova\_rd@chumakovs.ru

### Аннотация

Получены вирусоподобные частицы (ВПЧ) коронавируса штамма Aydar-1, состоящие из структурных белков: нуклеокапсидный (N), мембранный (M) белки, малый мембранный (E) и спайковый (S). ВПЧ нарабатывали в бакуловиральной системе экспрессии с использованием культуры клеток насекомых Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Структуру частиц изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

ВПЧ представляют собой самособирающиеся наноструктуры, содержащие ключевые вирусные структурные белки. ВПЧ по молекулярным и морфологическим признакам напоминают вирионы, но не являются инфекционными и реплицирующимися из-за отсутствия генетического материала [1]. Разработка вакцин на основе ВПЧ в настоящее время — одна из наиболее перспективных и активно развивающихся областей биотехнологии благодаря безопасности этого типа вакцин и потенциально высокой эффективности [2].

Для получения вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 выбрана бакуловиральная система экспрессии как одна из наиболее эффективных. На основе донорной плазмиды rFastBacDual сконструированы бицистронные векторы, содержащие по два структурных белка SARS-CoV-2 штамма Aydar-1: нуклеокапсидный (N) и мембранный (M) белки; малый мембранный (E) и спайковый (S) белки. Рекombинантные бакуловирусные ДНК получали путем трансформации бактерий *E. Coli*, штамм DH10Bac, и затем использовали их для получения исходных пассажей рекомбинантных бакуловирусов  $P_{0, M/N}$  и  $P_{0, S/E}$  путем трансфекции адгезионных клеток Sf9. Конструирование вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 проводили путем заражения суспензионной культуры клеток двумя видами рекомбинантных вирусов, прошедших 2 пассажа:  $P_{2, M/N}$  и  $P_{2, S/E}$  в равном соотношении. Во время работы клетки Sf9 были адаптированы к суспензионному способу культивирования, получен посевной банк. ВПЧ из клеток выделяли методом криодеструкции. В ходе работы подобраны условия для лабораторной первичной очистки с помощью ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте и мультимодальной хроматографии. Этапы выделения и очистки вирусоподобных частиц анализировали методом вестерн-блот-гибридизации. Использовали сыворотку кроликов, иммунизированных SARS-CoV-2, штаммом Aydar-1, и вторичные HRP-конъюгированные антитела.

В результате очистки в сахарозном градиенте выявлены фракции, содержащие белки S и N совместно (рис. 1). Полученные фракции объединяли. Проводили мультимодальную хроматографическую очистку. На хроматограмме наблюдается пик (рис. 2), анализ которого показал наличие белковых комплексов с S- и N-белками SARS-CoV-2. Структурные и антигенные свойства полученных комплексов анализировали с помощью электронной микроскопии и двукратной иммунизации мышей.

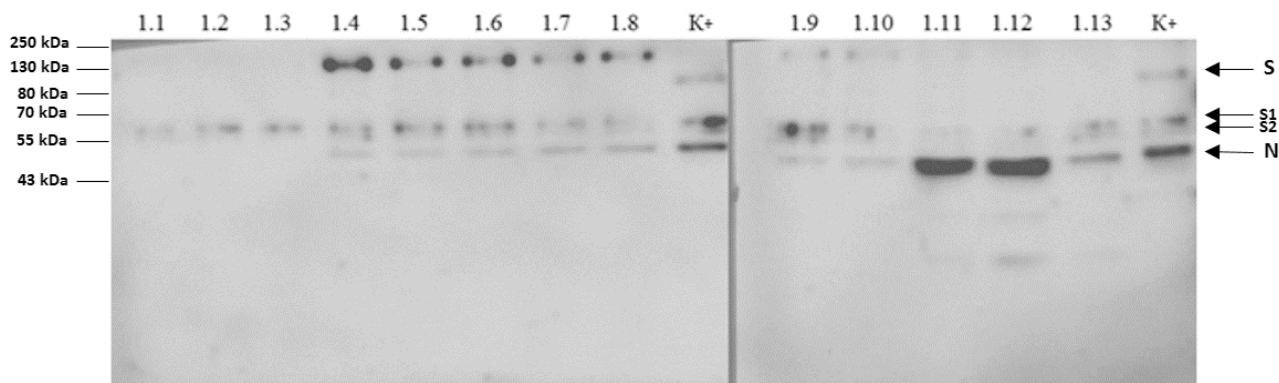


Рис. 1. Вестерн-блот-гибридизация фракций после очистки в сахарозном градиенте. В качестве антител использовали сыворотку кроликов, иммунизированных SARS-CoV-2, штаммом Aydar-1, и вторичные HRP-конъюгированные антитела

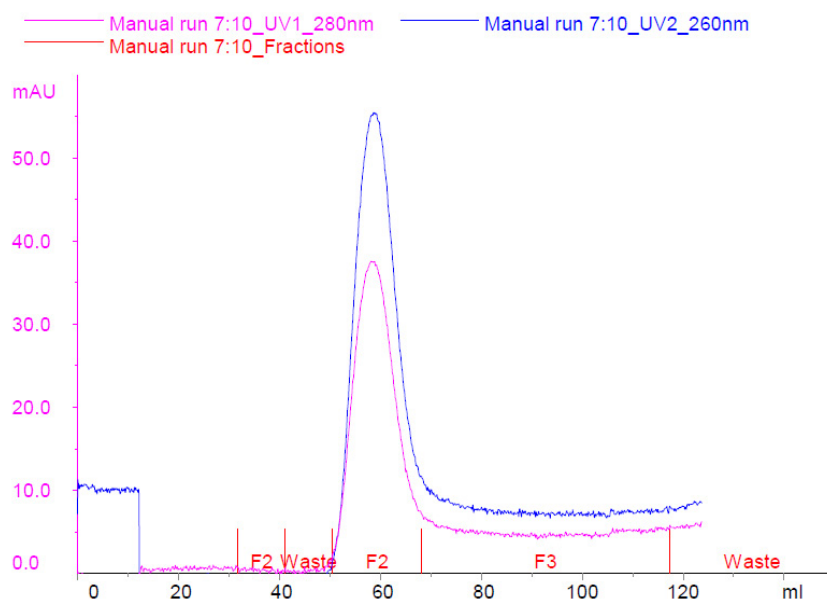


Рис. 2. Хроматограмма объединенных фракций, содержащих белки S и N совместно

### Литература

1. Ruodan Xu, Mingfei Shi, Jing Li, Ping Song, Ning Li. Construction of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles by Mammalian Expression System // Front Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 862.
2. Isak Jatoi, Jingyu Fan, Ij, Jf, Ij, Jf. A biomaterials viewpoint for the 2020 SARS-CoV-2 vaccine development // Biomater. Translational. 2021. Vol. 2 (1). P. 30–42.

## КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ SDS В РЕФОЛДИНГЕ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА GLP-1 АГОНИСТА

А. С. Яровиков, А. В. Казакова, А. А. Кузьминых, С. А. Ищук

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

✉ Aleksandr.Iarovikov@geropharm.com

**Аннотация**

В работе описан способ получения белка-предшественника GLP-1 агониста в виде tandemных повторов, что значительно повышает выход целевого продукта и позволяет экспрессировать его в бактериальной клетке в виде тельца включения для защиты от протеолиза. Рефолдинг и растворимость данной молекулы обеспечивает наличие SDS (*sodium dodecyl sulphate*) в растворе, удаление которого происходит при отмывке неионогенным ПАВ Tween-20, с последующей гельфильтрацией.

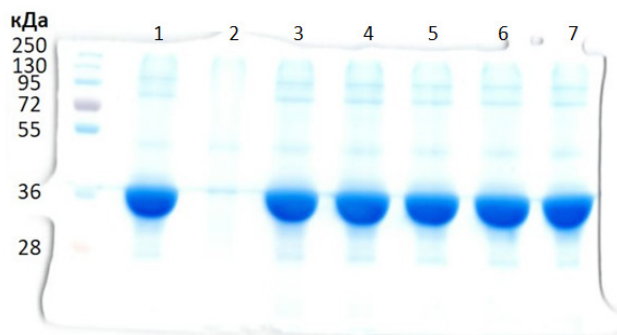
Промышленное получение коротких пептидов с применением бактериальной системы экспрессии затруднительно, поскольку наблюдается высокая степень деградации целевого продукта протеолитическими ферментами. Биосинтез пептидов в виде tandemных копий, во-первых, обеспечивает высокий выход белка на этапе биосинтеза, во-вторых, позволяет защитить целевой продукт от действия протеаз, поскольку tandemные белки склонны образовывать нерастворимые тельца включения внутри клеток. Однако данный тип экспрессии создает определенные затруднения на этапах ренатурации и дальнейшей очистки целевого продукта в связи с высокой склонностью получаемых молекул к агрегации и их крайне низкой растворимостью. В данной работе описаны эксперименты по подбору условий ренатурации tandemных белков на примере белка-предшественника GLP-1 агониста с применением подхода DOE (*design of experiment*) и последующим удалением солилизирующего агента методом гельфильтрации.

Объект исследования — белок-предшественник GLP-1 агониста, гибридный белок, включающий 10 tandemных повторов исходного пептида.

Подбор условий ренатурации гибридного белка (ГБ) проводили с помощью подхода DOE. На основании анализа литературы выявлено 12 факторов, способных повлиять на фолдинг белка: температура, pH, содержание мочевины, сахарозы, аргинина, SDS и др. С применением программного обеспечения MODDE 12.1 построен D-оптимальный план скрининга параметров, включающий 21 эксперимент. В качестве отклика взят показатель количественного содержания ГБ в пробе, определяемый методом капиллярного зонного электрофореза. Кроме того, для изучения компонентного состава проб использовали метод электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS по Лемми.

По результатам скрининга выявлено критическое влияние SDS на удержание гибридного белка в растворенном состоянии. Для подтверждения этой гипотезы на основе исходного буферного раствора приготовлена серия растворов, из состава которых исключали какой-либо компонент. Результаты эксперимента представлены на рисунке. Как можно видеть, критичным для ренатурации белка является только отсутствие SDS.

Основным механизмом, обеспечивающим увеличение растворимости белковой молекулы в присутствии SDS, является экранирование гидрофобных участков белка молекулами ПАВ от воздействия гидрофильной сре-



Изучение влияния SDS на процесс ренатурации ГБ GLP-1 агониста. Буферный раствор: 1 — исходный; 2 — без SDS; 3 — без изопропанола; 4 — без Tween-20; 5 — без сульфата аммония; 6 — без пропиленгликоля; 7 — без изопропанола, Tween-20, сульфата аммония, пропиленгликоля

ды. Вероятно, сниженная эффективность неионогенных ПАВ, таких как Tween-20 и Triton X-100, в процессе ренатурации белка-предшественника GLP-1 агониста связана с меньшим экранированием гидрофобных участков молекулы из-за отсутствия поверхностного заряда и длинного гидрофобного хвоста.

Удаление SDS из раствора проводили с помощью обработки смеси 1%-м раствором Tween-20 и последующей гельфильтрацией на сорбенте Sephadex G-25 методом, описанным Джанадо и др. [1]. Эффективность удаления оценивали по количественному содержанию SDS в растворе методом RP-HPLC. Диссоциацию целевого пептида и SDS, а также подлинность пептида контролировали методом ВЭЖХ-МС.

Таким образом, разработана технология, позволяющая ренатурировать труднорастворимые и склонные к агрегации белковые молекулы с применением SDS и последующим его удалением из раствора, с использованием нетоксичных ПАВ и высокопроизводительной гельфильтрации.

### **Литература**

1. Janado M. et al. Thermodynamic analysis of the nonspecific interaction of sodium dodecyl sulfate with swollen Bio-Gel beads // J. Biochem. 1979. Vol. 86, № 3. P. 795–802.

## РАЗДЕЛ III

## БИОФИЗИКА

**ВЛИЯНИЕ АИКАР НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ И УРОВЕНЬ ТРАНСРЕНАЛЬНОЙ ДНК КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**С. А. Абдуллаев<sup>1,2</sup>, Е. С. Воробьева<sup>1</sup>, Д. В. Салеева<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна, Москва<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

✉ saabdullaev@gmail.com

**Аннотация**

Настоящая работа посвящена изучению влияния соединения АИКАР на выживаемость мышей, частоту микроядер в клетках костного мозга мышей и экскрецию внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК с мочой у крыс, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения.

Поиски путей модификации радиочувствительности являются важнейшей фундаментальной проблемой как с позиции снижения последствий воздействия ионизирующих излучений (ИИ) на организм, так и с позиции повышения эффективности радиотерапии опухолей. Эффективность функционирования репарационных систем зависит не только от их полноценности, но и от количества индуцируемых повреждений ДНК, их сложности, а также энергообеспеченности развития ответа на повреждение ДНК (ОПД) [1]. При этом ключевую роль в поддержании энергетического гомеостаза в облученных малыми и сублетальными дозами ИИ клетках играет 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК). АМРК является полисубъединичным (гетеротримерным) комплексом — главным регулятором клеточного и системного энергетического гомеостаза. В ряде исследований показано, что дополнительной активации АМРК и митохондриального биогенеза в клетках удается достичь с помощью фармакологических соединений разного класса [2, 3]. Среди них значительный интерес представляет 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибоза (АИКАР), аналог АМФ, который транспортируется в клетки и широко используется в экспериментах.

Целью нашей работы явилось изучение влияния соединения АИКАР на выживаемость мышей и на частоту образования микроядер (МЯ) в клетках костного мозга, а также на экскрецию внеклеточной ядерной ДНК (вк-ДНК) и внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) с мочой крыс, облученных рентгеновскими лучами.

В исследовании использовались самцы мышей линии Balb/c 2-месячного возраста и самцы крыс линии Fisher-344 3-месячного возраста, полученных из питомника филиала Института биоорганической химии РАН (Пущино, Московская область). Для определения выживаемости мышей облучение проводили в дозе 8 Гр, а для анализа возникновения МЯ в клетках костного мозга в дозе 2 Гр. Крыс подвергали облучению в дозе 5 Гр. АИКАР (Merck, Darmstadt, Germany) вводили животным внутрибрюшинно по 400 мг/кг веса тела. Препарат вводили за 30 мин до и через 20 мин, 6 ч, 24 ч после облучения. Кривые выживаемости были получены для 30 животных на каждую кривую в каждом независимом эксперименте. Статистические различия в экспериментах на выживание между группами мышей сравнивались по методу Каплана–Майера. Различия между данными, полученными до и после обработки крыс, анализировали с помощью теста Манна–Уитни  $U$  или непарного  $t$ -критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средней величины (для восьми животных) и стандартной ошибки среднего значения ( $\pm$ SEM). Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

Результаты показали, что АИКАР оказывает радиопротекторное действие как по выживаемости мышей, так и по снижению частоты микроядер. Показано, что АИКАР оказывает значительный радиозащитный эффект только при его введении мышам сразу после облучения. Результаты анализов указывают, что радиомитигаторный эффект АИКАР на облученных животных, возможно, проявляется посредством митохондриально-направленного



---

механизма. Данные по анализу экскреции вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой облученных животных позволяют предполагать, что АИКАР также способствует ускоренному удалению поврежденных клеток и дисфункциональных митохондрий из тканей облученных животных посредством активации аутофагии (митофагии).

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что АИКАР действует как радиомитигаторный эффектор и имеет высокий потенциал в качестве радиозащитного средства для активного практического применения.

#### **Литература**

1. Jackson S., Bartek J. Nature. 2009, 461:1071-78.
2. Si W et al., Curr Eye Res. 2022, 25:1-13.
3. Kim HJ et al., J Physiol. 2022, 600:2359-2376.

## ХРОНОФИЗИОТЕРАПИЯ — НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКЕ

П. И. Бабич, В. Н. Зарубин

ООО «Сибирский инновационный центр», Новосибирск

✉ sicenter@bk.ru

### Аннотация

Работа относится к области медицинской биофизики и базируется на принципе ритмичности биопроцессов и явления усвоения внешних ритмов живыми организмами. На основе этих закономерностей разработана хронотехнология лечения заболеваний путём коррекции биоритмов больного организма и устранения десинхроноза.

Согласно свойству ритмичности живой материи все биопроцессы, протекающие в организме, периодически повторяются в определённых диапазонах частот и имеют свои биоритмы [1, 2]. Поэтому при заболевании в организме возникают две взаимозависимые (сопряжённые) патологии: физиопатология — нарушение биопроцессов и хронопатология — отклонение их биоритмов от нормы — десинхроноз. Таким образом, все заболевания сопровождаются десинхронозами и представляют собой комбинацию двух сопряжённых патологий: хронофизиопатологию, лечить которую можно как методами фармакотерапии, так и хронофизиотерапии. Это открывает новые возможности в области медицинской биофизики. Согласно принципу сопряжения этих патологий, устранение одной из них будет сопровождаться устранением другой, что имеет место в медицинской практике. В результате лекарственной терапии происходит восстановление биопроцессов, которое сопровождается нормализацией их биоритмов и устранением десинхроноза. Недостатком этих методов является побочное воздействие на организм, которое снижает эффективность и безопасность лечения. С другой стороны, возможности хронофизиотерапии в медицинской практике не используются. Проблема заключается в отсутствии аппаратных методов лечения десинхронозов путём коррекции отклонений, возникших в биоритмах больного организма.

С целью решения этой проблемы на основе явления усвоения внешних ритмов живыми организмами [3] разработан и запатентован метод ресинхронизации (восстановления) биоритмов больной ткани. Это явление лежит в основе адаптации биологических систем к внешним условиям и характеризует способность тканей, органов и организма в целом перестраивать свои биоритмы под воздействием внешних ритмов. В качестве источника внешних ритмов используется электромагнитное поле (ЭМП) частотой биоритмов здоровой ткани, в которой возник патологический процесс.

Принцип лечения заключается в следующем. Если на больную ткань подействовать ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани, то в результате явления усвоения ритма биоритмы больной ткани перестроятся на частоту биоритмов здоровой ткани, и произойдёт устранение десинхроноза, а это, согласно сопряжению патологий, приведёт к восстановлению нарушенных биопроцессов (устранению физиопатологии) и выздоровлению. Метод открывает новое направление в медицинской биофизике: лечение заболеваний путём устранения десинхроноза.

Для реализации этого метода разработан аппарат хронофизиотерапии «ФизиоМаг», который представляет собой аппаратно-программный комплекс (АПК) хрономагнитотерапии (ХМТ) с двумя функциями лечения: хронотерапии и магнитотерапии. Функция хронотерапии реализует основной метод лечения: аппарат генерирует заданную частоту из соответствующего диапазона биоритмов здорового организма, в результате чего в больной ткани возникает явление усвоения ритма, запускается процесс ресинхронизации биоритмов и устранения десинхроноза. Функция магнитотерапии реализует вспомогательный метод лечения, который за счёт реологического эффекта оказывает на организм дополнительное стимулирующее воздействие и тем самым ускоряет процесс выздоровления.

В результате целевого частотного воздействия на биоритмы больной ткани отсутствует побочное действие на организм и обеспечивается безопасность лечения. Отсутствие побочных эффектов и комплексная хрономагнитотерапия позволяют повысить эффективность лечения до 95 %. На аппарат получен патент РФ и регистрационное удостоверение Росздравнадзора.

### Литература

1. Зарубин В. Н. Принцип ритмичности биологических процессов // VIII Международный научно-исследовательский конкурс «Эксперт года 2020». Секция «Биологические науки»: Сб. статей. — Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2020. С. 9–13.
2. Загускин С. Л. Ритмы клетки и здоровье человека: Монография. Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ, 2010. 292 с.
3. Ужомский А. А. Усвоение ритма в свете учения о парабиозе // Избранные труды. Под ред. Е. М. Крепса. Ленинград: Наука, 1978. — 360 с. (Серия «Классики науки»).

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ФУНКЦИИ И СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ И ТРЕТИЧНЫХ СТРУКТУР\*

О. Е. Багрова, Е. В. Белова

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

✉ o-bagrova@mail.ru

### Аннотация

Различие структур белковых биомолекул обеспечивает многообразие их функций в живой системе. Данная работа представляет собой поиск взаимосвязи между структурой и функцией белков путём анализа распределений вторичных регулярных и нерегулярных, третичных суперспиральных структур функциональных групп белков. На основе полученных распределений выявляются особенности каждого класса в отдельности и ищутся общие закономерности, характерные для всех исследуемых структур.

Многообразие живых организмов представляется нам различными формами, местами обитания, поведением. Но есть и отличия, которые не так просто пронаблюдать. Многообразие белковых форм отвечает за различия в метаболизме, в механизмах проникновения вирусов в клетки хозяина, в способе транспортировки других молекул. Считается, что функция полипептида определяется его структурой [1]. При этом важна не только первичная структура, а именно аминокислотная последовательность, но и геометрия, включающая вторичные и третичные структуры. В более ранних работах был представлен анализ количественного содержания вторичных структур в белках [2]. Также было замечено, что олигопептиды равной длины могут выполнять схожие функции [3].

Настоящая работа представляет собой анализ распределений вторичных и третичных структур по белковым цепям нескольких функциональных классов. Подборка функциональных групп белков составлена на основе классификации базы данных PDB [4]. Для анализа были выбраны восемь функциональных классов: оксидоредуктазы, гидролазы, изомеразы, шапероны, структурные белки, белки вирусов, экзо- и эндоцитоза, транспорта электронов. Анализировались все доступные в PDB типы вторичных структур. Суммарно было проанализировано свыше 500 белков. Данные о структурах подборки также получены из базы данных PDB [4]. Анализ структур осуществляется с помощью специально разработанного и реализованного на языках программирования C++ и Python алгоритма. В результате программной обработки получены диаграммы распределения исследуемых структур по полипептидным цепям. В выбранной подборке белков из вторичных структур наблюдаются  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -листы,  $3_{10}$ -спирали, нерегулярные структуры. Поиск суперспиралей coiled coil происходит с помощью базы данных CC+ [5]. Анализ позволил выявить общие тенденции для обоих классов и отдельные особенности выбранных групп белков.

Выявление закономерностей в распределении вторичных и третичных структур, поиск взаимосвязи структуры и функции белковых молекул может пролить свет на физические основы фундаментальных механизмов фолдинга. Полученные результаты могут быть использованы при определении функции новых белков, разработке бионических материалов и лекарственных средств.

### Литература

1. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. М., 2012.
2. Adzhubei A.A, Eisenmenger F, Tumanyan V.G. et al. Approaching a complete classification of protein secondary structure // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 1987. V. 5(3). P. 689–704.
3. Замятин А. А. Физико-химические и функциональные характеристики полной системы природных олигопептидов // Акт. вопр. биол. физики и химии. 2018. Т. 3(1). С. 225–235.
4. <http://www.rcsb.org> (The Protein Data Bank).
5. <http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search> (Periodic Table of Coiled-Coil Protein Structures).

\* О. Е. Багрова является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС» (№ 21-2-1-14-1).  
© О. Е. Багрова, Е. В. Белова, 2022

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ С УЧЕТОМ КЛЕТОЧНОЙ МОРФОЛОГИИ ДЛЯ КОРРЕКТИРОВКИ АБЛЯЦИИ

А. К. Бережной, М. М. Слотвицкий, А. И. Калинин, В. А. Цвеляя, К. И. Агладзе

*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

✉ berezhnoi.ak@phystech.edu

### Аннотация

Абляция — создание «рисунка» из фиброзной ткани на поверхности сердца для устранения аритмии. Часто абляцию приходится повторять многократно для достижения результата, принятые методики предсказывают конфигурацию «рисунка» недостаточно хорошо. В работе описано создание модели сердечной ткани, позволяющей повысить успешность абляции благодаря более точному моделированию волновой динамики в ткани.

### Цель и задачи работы

Сегодня наиболее компетентным инструментом создания рисунка абляции является модель Трояновой [5], однако и она недостаточно точна для того, чтобы в среднем достигать успеха за одну процедуру. Основной задачей работы является создание более полной модели сердечной ткани для имитации влияния фиброза на проведение волн возбуждения в сердце.

Для того чтобы приблизиться к решению этой задачи, начались исследования в области создания модели клеток сердца, используемых в Лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ. В Лаборатории активно ведется исследовательская работа с использованием кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. На таком модельном объекте проводятся тестирования лекарств и изучаются механизмы развития и возникновения аритмии. Кроме того, линия клеток, используемая в этом проекте, является наиболее электрофизиологически «зрелой» [1] по сравнению с другими распространенными линиями, то есть хорошо отражает свойства реальных кардиомиоцитов человека.

Таким образом, основной целью данной работы является создание модели клеток и ткани сердца, полученных при помощи дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК). При этом данная модель будет учитывать и морфологию клеточной культуры, и ее электрофизиологические параметры.

В дальнейшем аналогичным образом модель будет валидирована на фенотипические данные биоптата человека для внедрения в процесс пациент-специфичной разработки рисунка абляции пациента.

### Материалы и методы

Получение человеческих желудочковых кардиомиоцитов проводилось по бессывороточному протоколу Gi-Wi путём последовательной активации и ингибирования сигнального пути WNT [5]. Основным методом для оценки жизнеспособности клеток и их электрофизиологической связанности является оптическое картирование. После оценки электромеханического сопряжения имплантированных клеток образец подвергается иммуноцитохимическому исследованию на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 710.

Обработка экспериментальных данных проводилась с помощью программного обеспечения ImageJ.

Математическое моделирование электрофизиологии ткани представляет из себя численное решение нелинейной системы дифференциальных уравнений, реализуемое методами параллельного программирования. Речь идет о системе нелинейных уравнений в полных производных типа Ходжкина–Хаксли.

Вычисления для моделирования морфологии ткани проводились на CPU IntelCore i7. Для объединения обеих моделей используется Wolfram Mathematica.

### Результаты

Прежде всего была произведена наработка данных для валидации клеточной модели. Для этого кардиомиоциты были выращены путем дифференцировки из ИПСК, доведены до зрелости и исследованы. С помощью оптического картирования определялась степень электрофизиологического связывания клеток между собой, а конфокальной микроскопии — маркеры зрелости клеток с применением различных антигенов. Была набрана достаточная для изучения фенотипа статистика для кардиомиоцитов и фибробластов.

Затем эти данные были обработаны для получения конкретного набора фенотипических параметров клеток. В конечном счете результатом являются параметры распределения параметров разных типов клеток: площади, линейных размеров и других величин.

Была полностью создана электрофизиологическая часть модели. После этого в систему был внесен ряд модификаций для поиска устойчивого решения в условиях анизотропии ткани. Необходимость модификаций связана с тем, что литературные данные рассчитаны на изотропные модели (не учитывающие форму клеток), что может вносить корректировки в решение задачи.

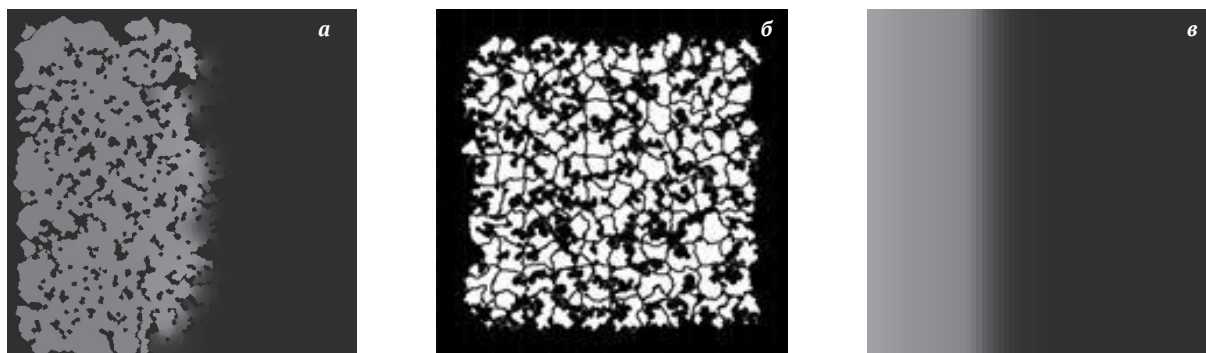


Рис. 1. Проведение в ткани с учетом морфологии (а); имитация морфологии ткани (б); проведение в изотропном слое (в)

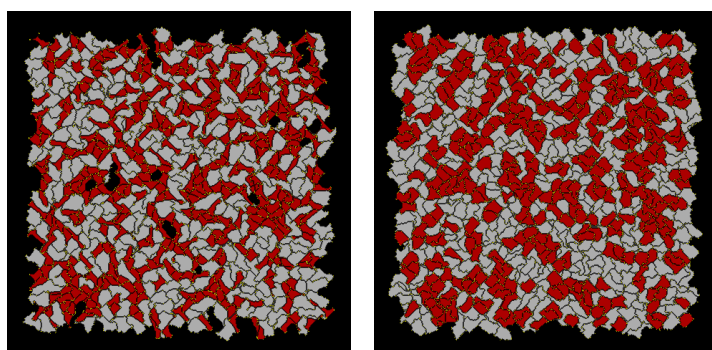
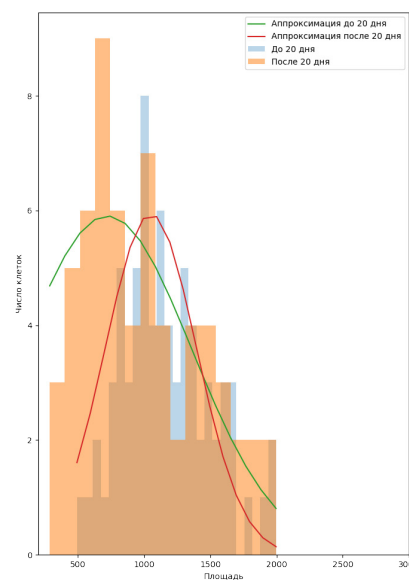


Рис. 2. Генерация монослоя при различных параметрах CPM (красный цвет — кардиомиоциты, серый — фибробласты)

Рис. 3. Измерения площадей клеток (кардиомиоцитов) в монослое клеток до и после 20 дня. Видно, что распределение смещается вправо



### Используемые источники

1. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer // *Toxicological Sciences*. — 2019. — Т. 168. — №. 1. — С. 70–77.
2. Kudryashova N. et al. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells // *PLoS computational biology*. — 2019. — Т. 15. — №. 3. — С. e1006597.
3. Ten Tusscher K. H. W. J., Panfilov A. V. Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2006. — Т. 291. — № 3. — С. H1088-H1100.
4. Wang H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // *The lancet*. — 2016. — Т. 388. — № 10053. — С. 1459–1544
5. Trayanova N.A. Whole-heart modeling: applications to cardiac electrophysiology and electromechanics // *Circulation research*. — 2011. — Т. 108. — №. 1. — С. 113–128.
6. Roth Gregory A. et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013 // *Circulation*. 2015. 132.17. P. 1667–1678.
7. Gray R. A., Pertsov A. M., Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation // *Nature*. — 1998. — Т. 392. — № 6671. — С. 75.
8. Kadota S. et al. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets // *European heart journal*. — 2012. — Т. 34. — № 15. — С. 1147–1156.
9. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer // *Toxicological Sciences*. — 2019. — Т. 168. — № 1. — С. 70–77.
10. Funakoshi S. et al. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes // *Scientific reports*. — 2016. — Т. 6. — С. 19111.

## РЕГИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ NO В НАРУШЕНИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРЕДСЕРДИЙ КРЫС ПРИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ ВЕГЕТАТИВНОГО ГЕНЕЗА\*

К. А. Бутова<sup>1</sup>, Т. А. Мячина<sup>1</sup>, Р. А. Симонова<sup>1</sup>, Д. В. Щепкин<sup>1</sup>, А. Д. Хохлова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург

✉ x.butova@gmail.com

### Аннотация

Исследовано изменение оксида азота (NO) и его вклад в нарушение сократительной функции одиночных кардиомиоцитов левого (ЛП) и правого (ПП) предсердий крыс при фибрилляции предсердий (ФП) вегетативного генеза. Полученные результаты указывают на ведущую роль NO в функциональном ремоделировании ПП при ФП вегетативного генеза.

Фибрилляция предсердий (ФП) вегетативного генеза — распространённое нарушение сердечного ритма. Данный тип ФП вызван гиперактивацией вегетативной нервной системы, что ведёт к дезорганизованной электрической активации миокарда предсердий и формированию субстрата для последующего структурного ремоделирования и нарушения сократительной функции [1]. Известно, что левое и правое предсердия (ЛП и ПП) различаются по своим структурно-функциональным характеристикам в норме, что может способствовать их различной роли в поддержании ФП [2]. Особый интерес представляет региональная оценка роли оксида азота (NO), одного из основных внутриклеточных посредников механоэлектрической обратной связи в кардиомиоцитах [3], в функциональном ремоделировании предсердий при ФП вегетативного генеза.

Цель исследования: оценить роль NO в нарушении сократительной функции одиночных кардиомиоцитов левого (ЛП) и правого (ПП) предсердий крыс при ФП вегетативного генеза.

Эксперименты выполнены на самцах крыс линии Wistar возрастом 9–10 недель в соответствии с Директивой 2010/63/EU и одобрены этическим комитетом ИИФ УрО РАН.

Пароксизмальная форма ФП вегетативного генеза инициировалась посредством внутривенного введения раствора ацетилхолин-CaCl<sub>2</sub> (60 мкг/мл AChCl, 10 мг/мл CaCl<sub>2</sub>) в дозировке 1,3 мл/кг в течение 7 дней. Для выявления пароксизмов до и после инъекции выполнялась регистрация ЭКГ. К дальнейшим манипуляциям допускались животные, для которых на ЭКГ отмечались *f*-волны и нерегулярные *R-R*-интервалы.

Изоляция одиночных кардиомиоцитов выполнялась посредством ретроградной перфузии изолированного сердца по Лангендорфу с авторскими модификациями [4]. Оценка содержания NO в кардиомиоцитах выполнялась с использованием флюорофора DAF-FM (Merck, США) на системе конфокальной микроскопии LSM710 (Carl Zeiss, Германия). Для оценки зависимости параметров укорочения/расслабления саркомеров кардиомиоцитов от изменения содержания NO при ФП, суспензии кардиомиоцитов ЛП и ПП инкубировались с донором NO Spermine NONOate (Merck, США) в течение 10 минут до начала измерений. Регистрация параметров укорочения саркомеров при механически ненагруженных сокращениях кардиомиоцитов выполнялась при помощи аппаратно-программного комплекса (IonOptix, США) при 1 Гц.

Обнаружено, что у интактных животных содержание NO в кардиомиоцитах ЛП было выше по сравнению с миоцитами ПП. При ФП вегетативного генеза содержание NO уменьшилось на ~63 % в ПП и ~80 % в ЛП. При ФП амплитуда и максимальная скорость укорочения саркомеров увеличились в кардиомиоцитах ПП, тогда как для параметров укорочения саркомеров ЛП не было найдено различий с интактной группой. Добавление донора NO к суспензии кардиомиоцитов восстановило параметры укорочения саркомеров ПП в группе ФП до контрольных значений, но не оказывало эффекта на параметры укорочения саркомеров ЛП.

Полученные результаты позволяют предположить, что уменьшение синтеза NO при ФП вегетативного генеза играет ведущую роль в нарушении сократительной функции ПП.

### Литература

1. Linz D., Elliott A.D., Hohl M. et al. Role of autonomic nervous system in atrial fibrillation // *International Journal of Cardiology*. 2019. V. 287. P. 181–188.
2. Chen P.S., Chen L.S., Fishbein M.C. et al. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy // *Circulation research*. 2014. V. 114(9). P. 1500–1515.
3. Boycott H.E., Nguyen M.N., Vrellaku B. et al. Nitric oxide and mechano-electrical transduction in cardiomyocytes // *Frontiers in Physiology*. 2020. V. 11. P. 606740.
4. Butova X.A., Myachina T.A., Khokhlova A.D. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart // *MethodsX*. 2021. T.8. C. 101189.

\* Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН и поддержаны грантом РФФИ № 22-75-10134.

## МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ $^1\text{H}$ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ РАСЧЕТА РИСКОВ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. С. Быков<sup>1,2</sup>, М. В. Молчанов<sup>1</sup>, Т. И. Пономарева<sup>3</sup>, С. Н. Корякин<sup>2</sup>, М. А. Тимченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

<sup>2</sup>Обнинский институт атомной энергетики —

филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ»

<sup>3</sup>Институт биологического приборостроения РАН, Пущино

✉ artemb209@gmail.com

### Аннотация

ЯМР-спектроскопия показала эффективность в определении метаболитов в биологических жидкостях, ее включение в исследования крови в начальный этап обследования пациента позволит сэкономить время до постановки диагноза и обнаружить заболевание на ранней стадии для своевременного лечения. Целью нашей работы было исследование крови двух групп крыс: с саркомой М1 и контрольной группы — на предмет выявления изменения метаболитов при развитии солидной опухоли.

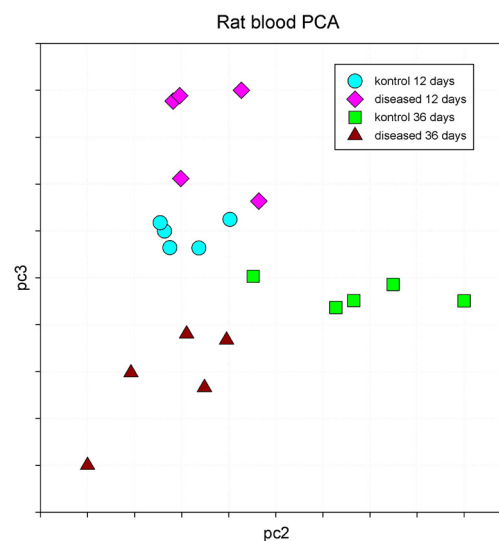
К настоящему времени накоплен огромный пул литературных данных по метаболическому анализу с помощью ЯМР-спектроскопии различных видов раков, как для модельных животных, так и для человека. Для пациентов чувствительность и специфичность выявления развития раковых заболеваний на ранних стадиях методом ЯМР-спектроскопии достигала 90–100 %, с такой же высокой специфичностью обнаруживалось развитие метастаз с помощью этого метода, а также дифференцировались различные виды рака и определялись их стадии [1–3]. Таким образом, использование ЯМР-спектроскопии для метаболического анализа периферической крови позволяет обнаруживать изменения метаболитов при развитии рака с высокой чувствительностью и специфичностью.

В исследовании использовались две группы крыс: с солидной опухолью саркома М1 и контрольная группа. Первый отбор крови проходил до наступления некроза опухоли (12 дней после привития опухоли), второй во время некроза за несколько дней до терминальной стадии (36 дней после привития опухоли). Кровь забиралась из хвостовой артерии путем ампутации кончика хвоста.

Благодаря ЯМР-спектроскопии было выявлено, что основные изменения при развитии опухоли затрагивают цикл глюкозы, аминокислот и жирных кислот. Были выявлены серьезные изменения в содержании следующих метаболитов: аллантоин, глюкоза, бетаин, холин, сукцинат, ацетон, лактат, валин и лизин. На основании полученных данных можно сделать выводы об изменении метаболитов со временем при развитии опухоли.

Дальнейший статистический многомерный анализ полученных результатов методом главных компонент (РСА) показал, что исследуемые группы крыс достоверно различаются между собой (см. рисунок).

В дальнейшем метод может помочь распределить животных с неустановленной патологией согласно их главным компонентам либо в группу здоровых, либо больных. Таким образом, ЯМР-спектроскопия позволяет выявлять малейшие изменения в метаболитах, вызываемые развитием патологии, что позволяет рассматривать ее как один из этапов диагностики для постановки и уточнения диагноза.



Распределение животных из разных групп в координатах двух главных компонент

### Литература

1. Larkin J.R., Anthony S., Johanssen V.A. et al. Metabolomic Biomarkers in Blood Samples Identify Cancers in a Mixed Population of Patients with Nonspecific Symptoms // Clin. Cancer Res. 2022. V. 28, P. 1651–1661.
2. Casadei-Gardini A., Del Coco L., Marisi G. et al.  $^1\text{H}$ -NMR Based Serum Metabolomics Highlights Different Specific Biomarkers between Early and Advanced Hepatocellular Carcinoma Stages // Cancers (Basel). 2020. V. 12. P. 241.
3. Singh A., Prakash V., Gupta N. et al. Serum Metabolic Disturbances in Lung Cancer Investigated through an Elaborative NMR-Based Serum Metabolomics Approach // ACS Omega. 2022. V. 7. P. 5510–5520.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА НОРМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Е. Р. Выпова<sup>1</sup>, Л. Н. Комарова<sup>1</sup>, П. С. Купцова<sup>1,2</sup>, А. А. Берсенева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Обнинский институт атомной энергетики —

филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ»

<sup>2</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск

✉ elena.vypova@yandex.ru

### Аннотация

Проведено исследование возможного радиопротекторного действия фумаровой кислоты при действии гамма-излучения на нормальные клетки человека. Радиозащитный эффект фумаровой кислоты оценен по показателю времени удвоения.

В современном мире актуальной и нерешенной проблемой является увеличение числа онкологических заболеваний. В 2020 г. в Российской Федерации выявлено 556 036 случаев онкологических заболеваний, совокупный показатель распространенности составил 2712,9 на 100 тыс. населения [1].

В онкологии применяются различные методы и подходы в лечении злокачественных новообразований. Основными методами являются лучевая терапия, хирургический метод и лекарственная терапия, однако ни один из них не является эффективным. В некоторых случаях негативным результатом применения лучевой терапии является развитие лучевых поражений нормальных тканей вследствие того, что излучение невозможно подвести к очагу поражения достаточно локально [2].

Радиопротекторы, применяемые при терапии опухолей, обладают некоторыми недостатками. Помимо того, что некоторые из них характеризуются острой и хронической токсичностью и это токсическое действие накапливается при многократном применении, радиопротекторы также не обеспечивают защиту организма при пролонгированном или фракционированном облучении низкой интенсивности.

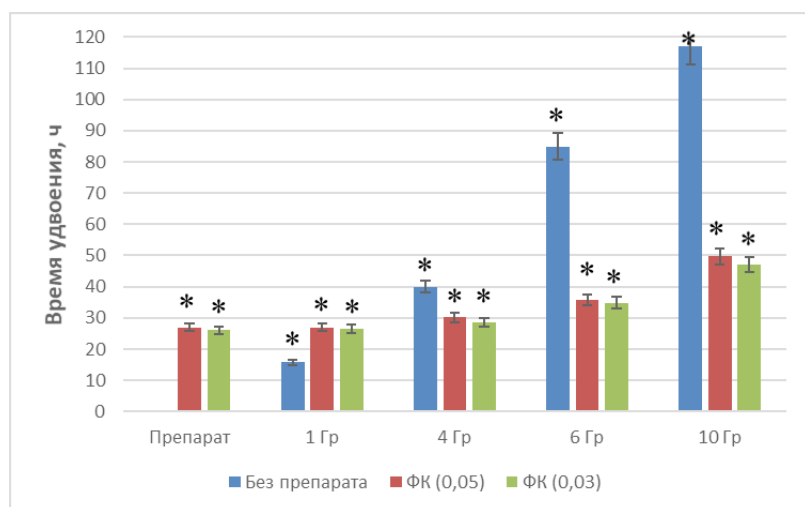
В настоящее время в радиобиологии и клинической онкологии одним из актуальных направлений является изучение способов повышения радиорезистентности окружающих опухоль нормальных клеток к действию ионизирующего излучения.

Объектом исследования была выбрана клеточная культура фибробластов (hTERT) человека. Культивирование проводилось по стандартной методике. Клетки были разделены на группы: в первой группе клетки подвергались действию только ионизирующего облучения (ИИ) — гамма-излучения (источник <sup>60</sup>Co, E = 1,25 МэВ); во второй группе клетки инкубировали 24 часа в растворе фумаровой кислоты в концентрациях 0,05 мг/мл и 0,03 мг/мл; третья группа клеток подвергалась комбинированному действию гамма-излучения и препарата.

Контролем служили интактные клетки. Выживаемость клеток оценивали по показателю времени удвоения.

На рисунке представлены результаты изменения времени удвоения клеток после 48 часов инкубации фибробластов с фумаровой кислотой без облучения, облучения гамма-квантами без препарата и комбинированном действии фумаровой кислоты и облучения в разных дозах.

На рисунке видно, что фумаровая кислота оказывает радиозащитное действие: время удвоения при комбинированном действии фумаровой кислоты с гамма-облучением в обеих концентрациях увеличивается не так активно, как



Время удвоения фибробластов после действия фумаровой кислоты, облучения и комбинированного действия фумаровой кислоты и облучения в разных дозах (\* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$ )



при действии только облучения в тех же дозах. Больше всего разница заметна при дозах облучения 6 и 10 Гр.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что фумаровая кислота в обеих исследуемых концентрациях оказывает радиозащитный эффект на нормальные клетки человека. На практике это позволит снизить негативный эффект ионизирующего излучения на нормальные клетки, окружающие опухоль.

#### **Литература**

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
2. Абдылдаев Т.А. Использование фторафура с радиомодифицирующей целью при лечении больных раком шейки матки / Т.А. Абдылдаев, С.Ш. Найзабекова // J. Medicine. 2015. № 10 (160). С. 61–64.

## АНАЛИЗ МОРФОТИПА И ИНВАЗИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ SKOV-3 ПРИ РОСТЕ В ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ МАТРИКСАХ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ МЫШИ \*

С. Д. Гефтер<sup>1</sup>, А. Д. Поспелов<sup>1</sup>, Д. Б. Трушина<sup>2,3</sup>, И. В. Балалаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

<sup>3</sup>Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН

✉ sofia.gieftier.00@mail.ru

### Аннотация

В данной работе нами было исследовано влияние биомеханических аспектов децеллюляризованного матрикса различных органов мыши на морфологию и миграционную активность клеток аденокарциномы яичника линии SKOV-3. Обнаружена зависимость перечисленных параметров от размера пор и компоновки волокон. Выдвинуто предположение, что данные структурные особенности внеклеточного матрикса могут являться ключевыми аспектами, определяющими активность роста и миграции опухолевых клеток *in vivo*.

Важную роль среди компонентов микроокружения опухолевых клеток в процессах миграции и формировании очагов опухолевого роста играет внеклеточный матрикс (ВКМ), отвечающий за структурные и биомеханические особенности тканей. Тканевые и органспецифические особенности ВКМ активируют адаптивный клеточный ответ, что приводит к изменению морфологии и инвазивной активности, в связи с чем модели на основе децеллюляризованных (ДЦЛ) матриксов показывают высокую эффективность в области экспериментальной онкологии за счет трехмерной локализации клеток. Такие модели позволяют сохранить нативные клетка-матрикс и клетка-клеточное взаимодействия, что позволяет изучать как фундаментальные особенности опухолевого роста, так и ответ на различные противоопухолевые препараты в условиях, приближенных к *in vivo*.

Целью данной работы являлось изучение влияния децеллюляризованных матриксов различных органов мыши на морфологию и инвазивный потенциал клеток аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3.

Для проведения децеллюляризации нами был разработан универсальный протокол, основанный на использовании таких детергентов как Triton X-100, додецилсульфат натрия (SDS) и дезоксихолат натрия (SDC) (рис. 1). Для оценки архитектуры и пористости полученные ДЦЛ матриксы подвергались сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью настольного сканирующего микроскопа Hitachi TM 4000 Plus. Для анализа влияния матрикса на морфологию и инвазивный потенциал матриксы подвергались рецеллюляризации клетками аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3 посредством нескольких инъекций на 1-й, 3-й и 5-й дни эксперимента, между которыми матриксы инкубировались в ростовой среде в лунках культурального планшета с пониженной адгезией (рис. 2). На 7-й день матриксы отправлялись на стандартное гистоморфологическое исследование.

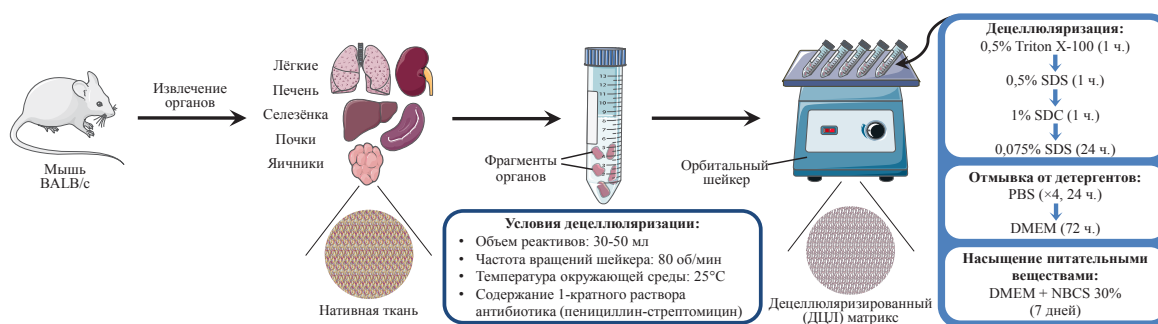


Рис. 1. Схема проведения децеллюляризации

В ходе данной работы были определены следующие структурные характеристики ДЦЛ матриксов: диаметр пор ВКМ у тканей органов уменьшался в ряде легкие ( $30 \pm 10$  мкм) > печень ( $12 \pm 5$  мкм) > почка ( $10 \pm 2$  мкм) >

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проекты № 19-74-20168 и № 21-74-10058).  
© С. Д. Гефтер, А. Д. Поспелов, Д. Б. Трушина, И. В. Балалаева, 2022

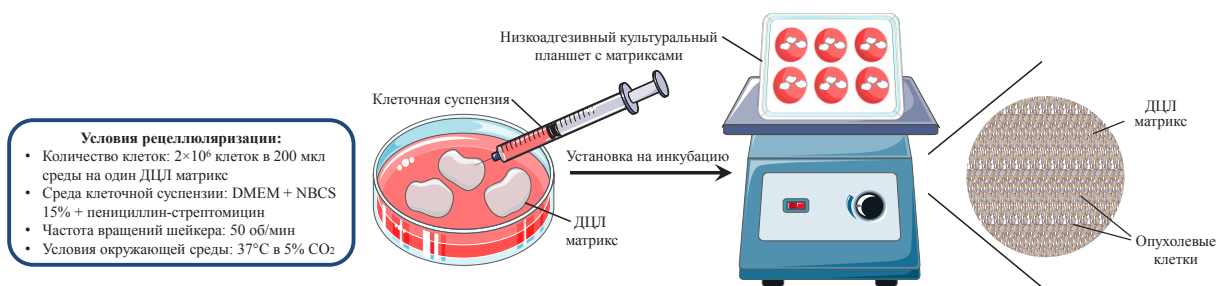


Рис. 2. Схема проведения рецеллюляризации

селезенка ( $5 \pm 1,6$  мкм) > яичник (< 2 мкм), при этом плотность организации матричных волокон уменьшалась обратно пропорционально размеру пор (рис. 3). Нами было показано, что изначально эпителиальный низкоинвазивный морфотип исследуемой линии клеток наблюдается при росте в матриксах селезенки и яичника. При этом нами было обнаружено изменение морфотипа на мезенхимальный, более инвазивно активный, при росте клеток в ДЦЛ матриксах легких, печени и почек (рис. 4). Исходя из полученных результатов, можно предположить, что более рыхлая упаковка матричных волокон и большой размер пор обеспечивают поддержание мезенхимального морфотипа и высокого инвазивного потенциала опухолевых клеток, в то время как плотная упаковка волокон и маленький размер пор обеспечивают сохранность эпителиального морфотипа и, соответственно, снижают инвазивный потенциал опухолевых клеток. Поскольку биомеханические параметры ВКМ оказывают существенное воздействие на формирование и метастазирование злокачественных опухолей, в дальнейшем мы планируем углубиться в изучении механочувствительности опухолевых клеток, расширяя разнообразие исследуемых объектов и механических свойств ВКМ. Исследования в данной области будут способствовать совершенствованию протоколов создания трехмерных моделей опухолевого роста на основе ВКМ, что будет иметь большое прикладное и фундаментальное значение в экспериментальной онкологии.

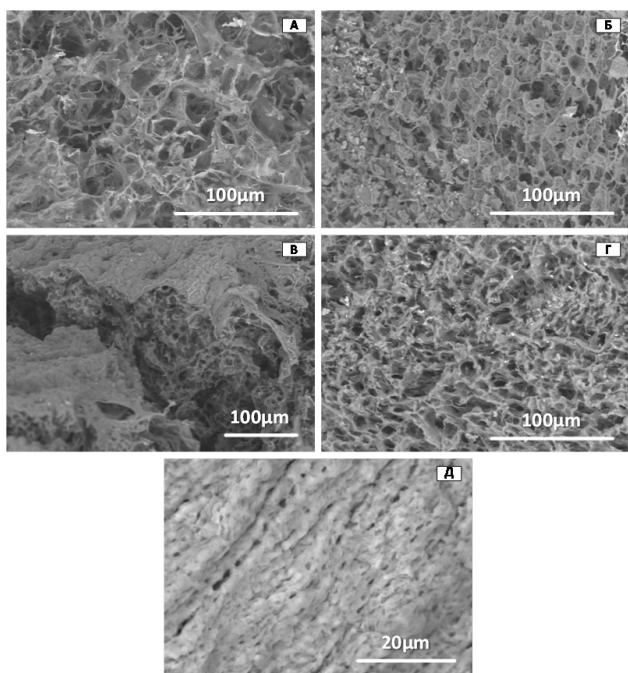


Рис. 3. СЭМ-изображения децеллюляризованных матриксов: А — легкое, увеличение  $\times 500$ ; Б — печень, увеличение  $\times 500$ ; В — почка, увеличение  $\times 300$ ; Г — селезенка, увеличение  $\times 500$ ; Д — яичник, увеличение  $\times 2000$

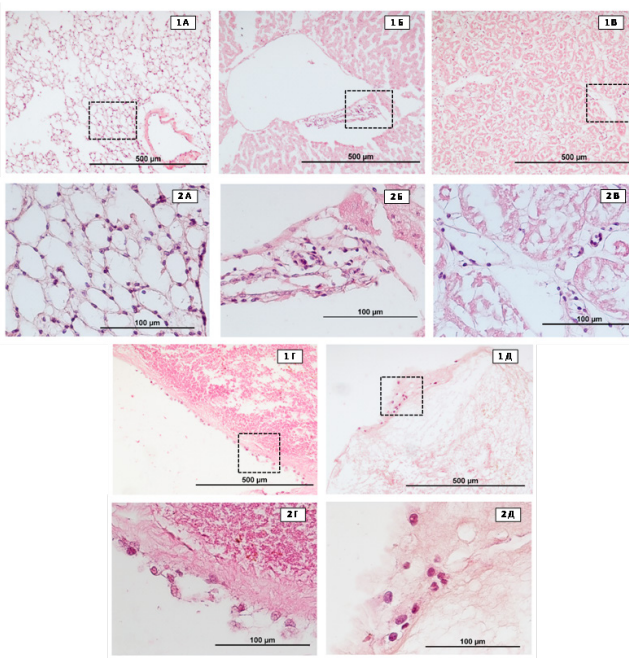


Рис. 4. Гистологические срезы децеллюляризованных матриксов. Окраска гематоксилином и эозином: 1 — увеличение  $\times 20$ ; 2 — увеличение  $\times 40$ ; А — легкое; Б — печень; В — почка; Г — селезенка; Д — яичник

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВНОГО ВОЗРАСТА ЭРИТРОЦИТОВ С УЧЕТОМ ПРОЦЕССА ВЕЗИКУЛЯЦИИ**А. В. Гисич<sup>1,2</sup>, Е. С. Ястребова<sup>1-3</sup>, В. П. Мальцев<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН*<sup>2</sup>*Новосибирский государственный университет*<sup>3</sup>*Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина*

✉ a.gisich@g.nsu.ru

**Аннотация**

В течение своего срока жизни эритроцит циркулирует в кровотоке 100–120 дней. Старение эритроцита приводит к уменьшению многих его морфологических и физиологических параметров: форма эритроцита изменяется с двояковогнутого дискоцита на сфероцит, объем и содержание гемоглобина уменьшаются на 30 и 20 % соответственно, а концентрация гемоглобина увеличивается на 14 %. Данные изменения эритроцитов происходят главным образом за счет процесса везикуляции, который тесно связан со старением, жизнеспособностью и гибелью клеток. Известно, что у здоровых людей везикулы быстро удаляются из кровотока, тогда как при некоторых патологиях концентрация везикул может изменяться.

Построение возрастных распределений является важным инструментом для диагностики заболеваний, связанных как с морфологическими, так и физиологическими нарушениями эритроцитов. К сожалению, существующие методы определения возраста эритроцитов недоступны в качестве простого и быстрого инструмента для скрининга состояния здоровья. В большинстве из них используется флуоресцентная или радиоактивная изотопная метка, что является долгим и довольно сложным методом, который особенно неудобен в случаях срочной необходимости анализа возрастных показателей. Более того, возрастное распределение, полученное с помощью методов меченя, не имеет зависимости с важными морфологическими изменениями эритроцита в процессе старения или процессом везикуляции.

Целью данной работы являлся поиск оптимального алгоритма расчета возраста эритроцитов, основанного на модели старения эритроцитов, включающей в себя изменения морфологии эритроцитов при везикуляции. Для достижения данной цели были выполнены следующие задачи.

1. Проанализирована морфология эритроцитов с помощью, сканирующей проточной цитометрии, позволяющей измерить основные морфологические характеристики одиночных эритроцитов.
2. Разработан оригинальный алгоритм оценки условного возраста одиночных эритроцитов.
3. Алгоритм применен на симулированных и экспериментальных данных для 50 условно здоровых доноров.

В результате работы был предложен новый методологический подход к измерению возраста одиночных эритроцитов, построены возрастные распределения для 50 доноров и вычислены референсные значения восьми эритроцитарных показателей категории старения.

## В ОТЛИЧИЕ ОТ КОНВЕЦИОНАЛЬНОГО ПРОТОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ, ОБЛУЧЕНИЕ ВО FLASH- И УЛЬТРА-FLASH-РЕЖИМАХ В ПИКЕ БРЭГГА АКТИВИРУЕТ ПРОАПОПТОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ *BAX* И *PUMA* В КЛЕТКАХ С МУТАНТНЫМ ГЕНОМ *p53* \*

С. И. Глухов<sup>1,2</sup>, С. В. Акулиничев<sup>1,3</sup>, Е. А. Кузнецова<sup>2</sup>, В. В. Мартынова<sup>1</sup>, И. А. Яковлев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт ядерных исследований РАН, Москва, Троицк

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино

<sup>3</sup>Больница РАН, Москва, Троицк

✉ serglukhovmb@gmail.com

### Аннотация

В работе впервые представлены данные об активации экспрессии проапоптотических генов *BAX*, *PUMA/BBC3*, гена контроля клеточного цикла *p21/CDKN1A* и гена контроля целостности генома *p53* в ответ на протонное облучение клеточных линий человека в модифицированном пике Брэгга в режимах протонной FLASH-терапии (мощность дозы >40 Гр/с) и одноимпульсной FLASH-терапии (ультра-FLASH) в сравнении с режимом конвенциональной протонной терапии (мощность дозы < 1 Гр/с).

Перспективным видом современной радиотерапии является FLASH-радиотерапия [1]. Большинство известных к настоящему моменту работ по FLASH-радиотерапии производились с использованием ускорителей электронов, что не позволяет в полной мере оценить роль пика Брэгга и линейной передачи энергии при FLASH-режиме подведения дозы. В данной работе облучение осуществлялось на уникальном ускорителе протонов ИЯИ РАН, способном к подведению дозы ускоренными протонами с мощностью дозы до 10<sup>6</sup> Гр/с.

Данное исследование направлено на анализ активации генов на уровне мРНК в ответ на облучение в различных режимах. Облучение ускоренными протонами линий раковых клеток с разным статусом гена *p53* — НСТ116 (*p53* дикого типа), НТ29 (*p53* мутированный, есть неполно-функциональный продукт) и нормальных фибробластов (*p53* дикого типа) производилось с разной мощностью дозы: в конвенциональном режиме (< 1 Гр/с), во FLASH-режиме (≈ 100 Гр/с) и в ультра-FLASH-режиме (≈ 10<sup>6</sup> Гр/с) как в модифицированном пике Брэгга, так и вне его. Доза облучения образцов составила примерно 10 Гр.

Генетическими мишенями данного исследования были выбраны гены: *p53* (осуществляет контроль целостности генома), *p21/CDKN1A* (осуществляет контроль клеточного цикла), *PUMA/BBC3* (участвует в запуске апоптоза), *BAX* (участвует в запуске апоптоза). В ответ на радиационное поражение ДНК гены *p21*, *BAX*, *PUMA* активируются белком p53, продуктом гена *p53* [2].

На модели радиорезистентной клеточной линии НТ-29, не имеющей полнофункционального p53, в результате анализа было обнаружено, что ген *p21* не способен активироваться ни при конвенциональном, ни при FLASH- и ультра-FLASH-режимах облучения, как в модифицированном пике Брэгга, так и вне его. Гены *BAX* и *PUMA* при облучении вне пика Брэгга в ультра-FLASH-режиме равно как и при конвенциональном облучении в пике Брэгга также не способны активироваться в отсутствие нормального гена *p53*. В то же время облучение во FLASH- и ультра-FLASH-режимах в пике Брэгга приводит к активации обоих проапоптотических генов *BAX* и *PUMA* примерно в четыре раза.

В клетках, несущих ген p53 дикого типа (фибробласты и радиочувствительная раковая линия НСТ116), облучение в пике Брэгга приводило к существенной активации генов *p21*, *BAX* и *PUMA* для всех трех режимов (конвенциональном, FLASH, ультра-FLASH) в пике Брэгга. Облучение клеток вне пика Брэгга в режиме ультра-FLASH существенно меньше активировало гены апоптоза и в большей степени — ген контроля клеточного цикла *p21* в нормальных фибробластах, что указывает на меньшее поражение при облучении вне пика Брэгга нормальных клеток, лежащих вне опухоли на пути терапевтического протонного пучка, и может быть ценно для радиотерапии.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу необходимости более глубокого изучения радиобиологических основ FLASH- и ультра-FLASH-облучения в целях развития протонной терапии за счет вовлечения более широкого спектра противоопухолевых биологических механизмов. Также полученные результаты свидетельствуют в пользу необходимости развития комбинированной прицельной BAX-ориентированной химиотерапии и протонной FLASH-радиотерапии.

### Литература

1. Sharma R. A. and Jones G. D. D. Novel Radiobiology is an Essential Pillar for the Future of Radiation Oncology // Clin. Oncol. 2021. V. 33. I. 11. P. 681–682.
2. Hafner A. et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2019 V. 20. P. 199–210.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 22-25-00211.

© С. И. Глухов, С. В. Акулиничев, Е. А. Кузнецова, В. В. Мартынова, И. А. Яковлев, 2022

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕЦЕПТОРНОГО БЕЛКА СЛАДКОГО ВКУСА С АГЕНТАМИ, ВЫЗЫВАЮЩИМИ ОЩУЩЕНИЕ СЛАДКОГО ВКУСА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ\*

В. М. Гольшев, Д. В. Пышный, А. А. Ломзов

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

✉ lomzov@niboch.nsc.ru

### Аннотация

Основным рецептором сладкого вкуса у человека (human Sweet Taste Receptor, hSTR) является комплекс, состоящий из двух белков TAS1R2 и TAS1R3. В качестве агентов, способных вызывать ощущение сладкого вкуса, могут выступать как малые молекулы (сахароза или аспартам) или белки и пептиды (лизоцим и браззеин). На данный момент процесс, вызывающий ощущение сладости, не до конца ясен. В данной работе построены полноатомные модели hSTR и его комплексов с низко- и высокомолекулярными соединениями, вызывающими ощущение сладкого вкуса. Предложена модель передачи сигнала рецептором при связывании соединений. Найдены параметры взаимодействия, коррелирующие со сладостью проанализированных соединений.

Рецептор сладкого вкуса у человека представляет из себя гетеродимер двух белков TAS1R2/TAS1R3, которые принадлежат к подклассу С-рецепторов, сопряженных с G-белком (G-protein-coupled receptors, GPCRs). GPCR передают сигнал снаружи внутрь клетки [1]. Данные рецепторы играют важную роль в том числе в межклеточной коммуникации. Каждый белок рецептора сладкого вкуса состоит из трех структурных элементов: домена «венерина мухоловка» (VFTD), цистеин богатого домена (CRD), а также трансмембранного домена (TMD). На данный момент в литературе не представлено экспериментально определенной полноразмерной структуры данных белков, не вполне ясен механизм передачи сигнала при связывании «сладкой» молекулы с hSTR [2]. Кроме того, отсутствуют данные о том, какие количественные параметры сладкого соединения влияют на ощущение сладкого вкуса.

Целью данной работы было создание полноатомной модели hSTR, которая позволяет объяснить механизм передачи сигнала при связывании сладкого соединения с рецептором.

При решении поставленной задачи был использован ряд различных методов компьютерного моделирования и анализа. Рассмотрены различные подходы для построения трехмерной структуры димерного комплекса TAS1R2/TAS1R3 и определены оптимальные для построения реалистичной пространственной структуры данного рецептора. Построены модели комплексов рецептора сладкого вкуса с соединениями, индуцирующими ощущение сладкого вкуса. Проведено моделирование таких комплексов в бислоистой липидной мембране и анализ полученных данных. На основании результатов предложена механистическая модель трансдукции сигнала рецептором после взаимодействия со «сладкой» молекулой. Были получены наборы физических величин, которые количественно коррелируют со сладостью проанализированных соединений.

Полученные результаты будут использованы для поиска новых улучшенных соединений, обладающих сладким вкусом.

### Литература

1. Pin J. P., Galvez T., Prézeau L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors // *Pharmacology & therapeutics*. 2003. Т. 98. №. 3. С. 325–354.
2. DuBois G. E. Molecular mechanism of sweetness sensation // *Physiology & Behavior*. 2016. Т. 164. С. 453–463.

\* Работа выполнена в рамках договора с ООО «ИЦ «Бирюч-НТ».  
© В. М. Гольшев, Д. В. Пышный, А. А. Ломзов, 2022

## ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА М1 ВИРУСА ГРИППА А НА СТАДИИ ЭНДОЦИТОЗА\*

З. Г. Дениева, О. В. Батищев

*Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина, Москва*

✉ zaret03@mail.ru

### **Аннотация**

Оболочечные вирусы, в число которых входит вирус гриппа А, способны вызывать серьезные эпидемии и пандемии мирового масштаба. Одним из основных компонентов вируса гриппа А является матриксный белок М1, который играет важную роль на нескольких этапах инфицирования клетки-мишени. Исследована кинетика адсорбции матриксного белка М1 вируса гриппа А на модельных липидных мембранах для выявления физико-химических механизмов его действия в условиях эндосомы.

Вирус гриппа А является представителем оболочечных вирусов. Он попадает в клетку путем эндоцитоза. Для высвобождения вирусного генома в цитоплазму клетки необходимо разрушить каркас из белков М1, расположенный под липидной оболочкой вируса. Белок М1 является консервативным для различных штаммов и состоит из более упорядоченного NМ-домена и слабоупорядоченного С-домена. Однако роль М1 на стадии слияния вируса с эндосомой не до конца ясна.

В данной работе использованы различные модели липидных мембран (плоские мембраны, липидные нанотрубки и гигантские однослойные везикулы) для конструирования внутриэндосомальных условий. В этих условиях исследована кинетика адсорбции белка М1 и показано, что он является активным участником процесса перестройки вирусной мембраны на стадии эндоцитоза.

Важным моментом в исследовании было определение индивидуальных условий, необходимых для такой перестройки. Так, было выяснено, что триггером является перепад значений рН между кислыми и нейтральными условиями. Кроме того, сравнение активностей полноразмерного белка М1 и его NМ-домена показало, что только полноразмерный белок способен изменять топологию липидной мембраны.

---

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 20-54-14006.  
© З. Г. Дениева, О. В. Батищев, 2022

## СВЯЗЬ КВАЗИСТАТИЧЕСКОГО КОЭФФИЦИЕНТА ЖЕСТКОСТИ И ГИГАГЕРЦОВОГО МОДУЛЯ УПРУГОСТИ ГИДРОГЕЛЕВЫХ ПЛЕНОК \*

Е. А. Добрынина<sup>1,2</sup>, В. А. Зыкова<sup>2</sup>, Н. В. Суровцев<sup>2</sup>, А. В. Лактионова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт автоматизации и электрометрии СО РАН, Новосибирск

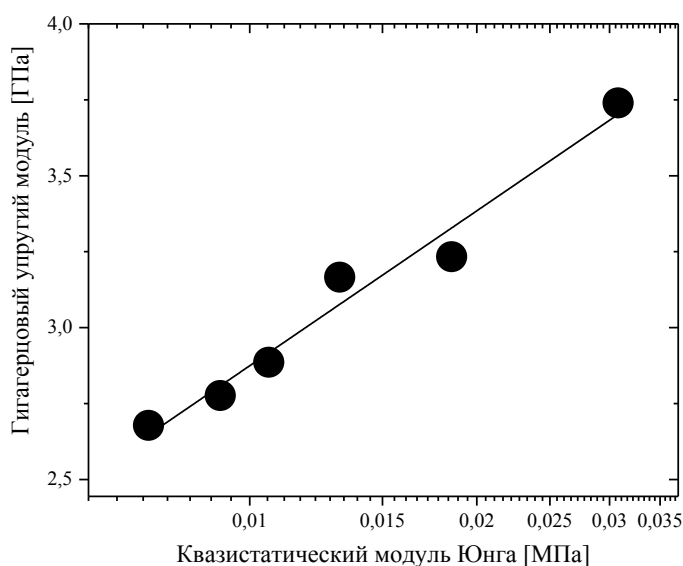
✉ e.dobrynina@g.nsu.ru

### Аннотация

Гидрогели обладают высокой биосовместимостью и способностью имитировать высокогидратированные ткани организма. Они содержат большое количество воды, которая влияет на упругие свойства материала, информация о которых может быть получена с применением метода рассеяния Мандельштама–Бриллюэна (РМБ). В ходе работы была установлена связь между содержанием воды в образце и параметрами спектра РМБ, а также найдена связь между гигагерцовым модулем упругости и квазистатическим модулем Юнга, полученным из механических тестов.

Основой соединительной ткани организма является коллаген, который обеспечивает прочность и эластичность ткани. Продуктом денатурации этого белка является желатин. Гидрогели на основе желатина широко используются в медицинской сфере и тканевой инженерии, а также в качестве среды при культивировании клеток за счет его дешевизны и легкодоступности. Гидрогель представляет собой сеть сшитых гидрофильных полимерных цепей, пространство между которыми заполняет вода. Вода оказывает существенное влияние на характеристики гидрогеля, в частности, на упругий модуль. Спектроскопия рассеяния Мандельштама–Бриллюэна способна давать информацию о вязкоупругих свойствах материала, являясь при этом бесконтактной, неинвазивной экспериментальной методикой. В научном сообществе активно обсуждается вопрос установления связи между гигагерцовым продольным модулем упругости, который может быть получен из бриллюэновского эксперимента, и квазистатическим модулем Юнга, получаемым из механических тестов. Наличие зависимости могло бы существенно расширить возможности бриллюэновской спектроскопии в применении к биологическим тканям.

В настоящей работе спектроскопия рассеяния Мандельштама–Бриллюэна используется для исследования упругих свойств гидрогеля на основе желатина. В результате была установлена связь между содержанием воды в образце и параметрами спектра, определяющими вязкоупругие свойства материала, такие как скорость звука и гигагерцовый упругий модуль, которая демонстрирует линейный характер зависимости. А также была разработана методика определения квазистатического модуля Юнга гидрогелевых образцов, основанная на исследовании деформации пленки под действием шара-индентора в магнитном поле [1]. Построенная модель



Связь гигагерцового упругого модуля и квазистатического модуля Юнга в исследованных образцах

деформации мембраны по поверхности конуса под действием индентора успешно описала полученные экспериментальные данные и позволила определить квазистатический модуль Юнга модельных образцов, который существенно меняется с изменением содержания воды в пленке.

Было проведено сравнение гигагерцового модуля упругости из спектроскопии РМБ и модуля Юнга из механических тестов для серии пленок денатурированного коллагена с различным содержанием воды. Данные представлены на рисунке с использованием логарифмической шкалы по оси абсцисс. В этом представлении полученные экспериментальные данные могут быть описаны выражением  $M = A \times \log(E) + B$  со значениями  $A = 1,69$  и  $B = 6,26$ .

Таким образом, была установлена численная связь между модулями, определенными

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ №21-74-00122.



---

двумя различными методами, которая может быть использована для предсказания значения квазистатического модуля Юнга на основании данных бриллюэновского эксперимента.

#### **Литература**

1. Зыкова В. А., Суровцев Н. В., Добрынина Е. А., Адищев С. В., Лактионова А. В. Метод измерения упругих свойств тонких биорелевантных пленок // Автометрия. Т. 58. № 2. С. 3–8.

## БОР-, ГАДОЛИНИЙСОДЕРЖАЩИЕ НАНОБИОКОМПОЗИТЫ АРАБИНОГАЛАКТАНА ДЛЯ МНОГОКАНАЛЬНОЙ ТЕРАНОСТИКИ

И. Д. Евсеев<sup>1</sup>, Т. В. Конькова<sup>2</sup>, Н. В. Клушина<sup>2</sup>, А. В. Ромащенко<sup>3</sup>, Б. Г. Сухов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

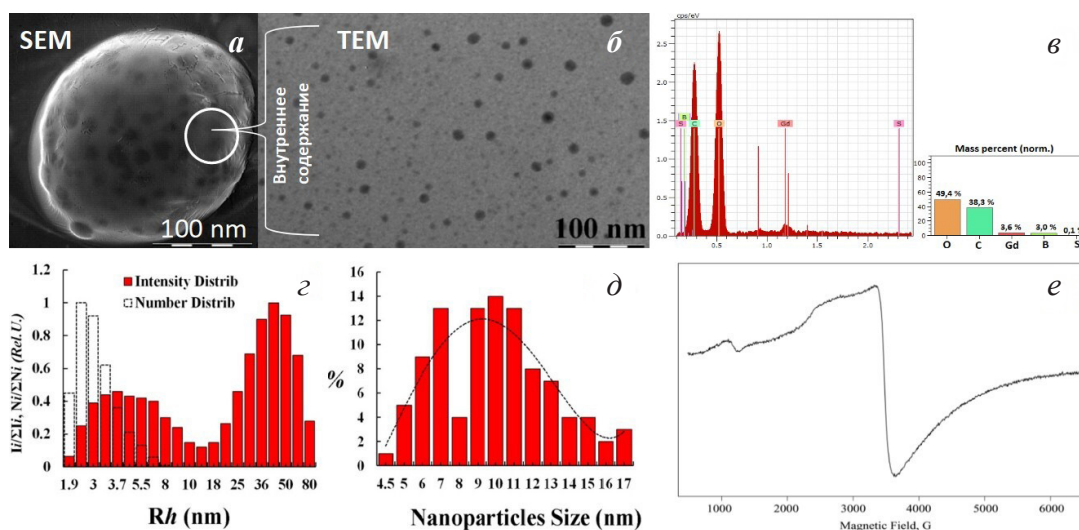
✉ boris\_sukhov@mail.ru

### Аннотация

Получен водорастворимый нанобиокомпозит, представляющий собой наночастицы бората гадолиния, инкапсулированные в макромолекулы арабиногалактана, способные проникать через гематоэнцефалический барьер. Новый нанобиокомпозит обладает комплексом магнитных и нейтронозахватных свойств, что делает его перспективным средством для параллельной многоканальной терапии и диагностики (тераностики).

Развивается методология синтеза гибридных неорганно-органических наноконкомпозитов [1–5], представляющих собой различные неорганические наночастицы (с комплексом магнитных [1, 6, 7], фотоактивных [7–9], нейтронозахватных и других свойств), инкапсулированные в макромолекулы биотаргетных полимеров [10, 11].

Гидротермально получены парамагнитные наночастицы  $GdBO_3$  (содержание В и Gd 3,0–3,6 %) со средним размером 4,5–17,0 нм, инкапсулированные в макромолекулы арабиногалактана со средним размером 150 нм, способные проникать через гематоэнцефалический барьер (см. рисунок, а–е).



Снимок сканирующего электронного микроскопа (SEM) макромолекулы арабиногалактана, загруженной наночастицами  $GdBO_3$  (а); снимок просвечивающего электронного микроскопа (ТЕМ) наночастиц  $GdBO_3$  в макромолекулах арабиногалактана (б); рентгеновский энергодисперсионный анализ (в); полидисперсность наноконкомпозитных частиц по данным динамического светорассеивания (г); полидисперсность наночастиц  $GdBO_3$  по данным просвечивающей электронной микроскопии (д); спектр электронного парамагнитного резонанса (е)

По измеренным временам магниторелаксации T1 и T2 водного раствора парамагнитного нанобиокомпозита можно сделать вывод, что полученный нанобиокомпозит является высокоэффективным магнитоконтрастом для МРТ:

### Магниторелаксивности нанобиокомпозита

	Релаксивность	
	r1 [л/ммоль·с]	r2 [л/ммоль·с]
Препарат сравнения Гадовист®	3,06	4,17
Новый нанобиокомпозит	5,69	21,44

### Литература

1. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г., Александрова Г.П. и др. Наноконпозиты с магнитными, оптическими, каталитическими и биологически активными свойствами на основе арабиногалактана // Докл. АН. 2003. Т. 393. № 5. С. 634–635.
2. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г., Носырева В.В. и др. Наноконпозиты Pd(0)-арабиногалактан как катализаторы димеризации ацетиленовых соединений // Докл. АН. 2007. Т. 417. № 1. С. 62–64.
3. Мячина Г.Ф., Коржова С.А., Ермакова Т.Г. и др. Наноконпозиты серебра и сополимера поли-1-винил-1,2,4-триазола с натриевой солью метакриловой кислоты // Докл. АН. 2009. Т. 427. № 6. С. 790–792.
4. Мячина Г.Ф., Конькова Т.В., Коржова С.А. и др. Наночастицы золота, стабилизированные водорастворимым биосовместимым поли-1-винил-1,2,4-триазолом // Докл. АН. 2010. Т. 431. № 1. С. 50–51.
5. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Долмаа Г. и др. Синтез серебросодержащих наноконпозитов на основе гуминовых веществ бурого угля и их антиоксидантная активность // Докл. АН. 2014. Т. 456. № 1. С. 56–59.
6. Petrova M.V., Kiryutin A.S., Savelov A.A. et al. A theoretical and experimental study of NMR contrasting properties of nanocomposites based on ferric oxides stabilized by arabinogalactan matrix // Appl. Magn. Res. 2011. V. 41. P. 525–536.
7. Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P. et al. Chiroplasmonic magnetic gold nanocomposites produced by one-step aqueous method using k-carrageenan // Carbohydr. Polym. 2017. V. 175. P. 18–26.
8. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П. и др. Кинетика формирования наночастиц золота в полисахаридной матрице галактоманнана // Докл. АН. 2011. Т. 440. № 5. С. 639–642.
9. Шурыгина И.А., Родионова Л.В., Шурыгин М.Г. и др. Конфокальная микроскопия в изучении влияния оригинальных проферментных наногликоконъюгатов элементного селена на регенерацию опорных тканей // Изв. РАН. Сер. физ. 2015. Т. 79. № 2. С. 280–282.
10. Ганенко Т.В., Костыро Я.А., Сухов Б.Г. и др. Наноконпозит серебра на основе сульфатированного арабиногалактана, обладающий антимикробной и антитромботической активностью, и способ его получения // Патент РФ № 2462254, 2012.
11. Папкина А.В., Перфильева А.И., Живетьев М.А. и др. Влияние наноконпозита селена и арабиногалактана на жизнеспособность фитопатогена *Clavibacter Michiganensis* Subs. *Sepedonicus* // Докл. АН. 2015. Т. 461. № 2. С. 239–241.

**БИОМЕХАНИКА ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ\***

Ю. М. Ефремов<sup>1</sup>, В. П. Преснякова<sup>1</sup>, И. М. Зурина<sup>1,2</sup>, П. И. Котенева<sup>1</sup>, Н. В. Кошелева<sup>1-3</sup>, П. С. Тимашев<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Институт регенеративной медицины, Сеченовский университет, Москва

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва

<sup>3</sup>Центр «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», Сеченовский университет, Москва

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

✉ efremov\_yu\_m@staff.sechenov.ru

**Аннотация**

Трехмерные клеточные структуры, включая пласты и сфероиды, представляют собой модельную систему для изучения биохимических и биофизических межклеточных взаимодействий. Результаты работы показывают, что взаимодействия между клетками и матриксом, а также клеточная сократимость определяют механические свойства многоклеточных агрегатов, важных в норме, при патологии и в регенеративных процессах.

Многоклеточные структуры, полученные *in vitro*, можно рассматривать как промежуточный уровень организации между отдельными клетками и сложными тканевыми структурами, представленными *in vivo*. Многоклеточные структуры все чаще используются как для фундаментальных исследований, так и для практических приложений [1, 2]. В частности, клеточные пласты и сфероиды обладают такими полезными свойствами, как наличие предварительно сформированных межклеточных контактов и синтезированного внеклеточного матрикса (ВКМ), которые вместе приводят к формированию микроокружения, более близкого к нативным тканям. И сфероиды, и клеточные пласты могут использоваться в тканевой инженерии в качестве бескафолдных структур, материала для биопечати или в сочетании с различными скаффолдами [1, 2].

Многие предыдущие исследования были сконцентрированы на биологии многоклеточных структур, однако очень мало данных доступно об их механических свойствах [3]. Понимание механического поведения является необходимым шагом для установления фундаментальных принципов тканевой биомеханики, тесно связанных с механизмами образования новых тканей, регенерации и развития патологий. Механические взаимодействия влияют на формирование клеточных агрегатов, жизнеспособность и процессы слияния. Настройка механических свойств является многообещающим путем для повышения эффективности таких процессов.

Одним из доступных методов изучения механических свойств клеток и ВКМ является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [4], которая позволяет оценивать локальные вязкоупругие свойства материалов. В данной работе использовали линии фибробластов мыши и крысы, а также мезенхимальные стромальные и эпителиальные клетки человека. С помощью одновременного наблюдения за морфологией и механикой на уровне единичных клеток и агрегатов с помощью АСМ были получены данные, свидетельствующие о релаксации напряжений в цитоскелете в процессе открепления клеток от субстрата и формирования пласта. Оценка вклада элементов ВКМ в механику сформировавшихся пластов требует методов с большей степенью деформации материала, тогда как метод АСМ ограничен поверхностным слоем клеток. В данной работе был также применен метод микроиндентации, показавший, что роль ВКМ может расти с увеличением времени культивирования клеточного пласта.

Для изучения сфероидов, помимо АСМ, был применен метод сжатия между пластинами. Сравнение данных двух этих методов позволило установить эффективное поверхностное натяжение сфероида, а также роль ВКМ при макроскопической деформации. Результаты работы могут быть востребованы для моделирования процесса формирования клеточных пластов, слияния сфероидов и для управления их механическими свойствами.

**Литература**

1. Zurina I.M., Presniakova V.S., Butnaru D. V. et al. Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach // *Acta Biomater.* 2020. Vol. 113. P. 63–83.
2. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation // *J.R. Soc. Interface.* 2017. Vol. 14. P. 20160877.
3. Efremov Y.M., Zurina I.M., Presniakova V.S. et al. Mechanical properties of cell sheets and spheroids: the link between single cells and complex tissues // *Biophys. Rev.* 2021. Vol. 13. P. 541–561.
4. Viji Babu P.K., Rianna C., Mirastschijski U., Radmacher M. Nano-mechanical mapping of interdependent cell and ECM mechanics by AFM force spectroscopy // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. P. 1–19.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 21-15-00349.

© Ю. М. Ефремов, В. П. Преснякова, И. М. Зурина, П. И. Котенева, Н. В. Кошелева, П. С. Тимашев, 2022

## ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ АДГЕЗИВНО-АГРЕГАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В НАТИВНОЙ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЗОНАНСНЫХ ЧАСТОТАХ

В. П. Демкин<sup>1</sup>, Т. В. Руденко<sup>1</sup>, А. А. Жуковская<sup>1</sup>, Л. Ю. Котловская<sup>2</sup>, В. В. Удут<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный университет

<sup>2</sup>НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ

✉ nastya120498z@mail.ru

### Аннотация

Выполнено исследование влияния скоростей сдвиговой деформации на динамику адгезивно-агрегационных процессов в нативной крови методом низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ). Теоретические расчеты и лабораторные эксперименты позволили наглядно оценить процесс изменения вязкоупругих свойств крови при различных резонансных частотах измерительного элемента.

В начальных фазах свертывания крови ключевую роль играют адгезивно-агрегационные процессы ее форменных элементов (тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов). При повреждении сосуда происходит активация тромбоцитов, что является важным элементом для нормального гемостаза. Это необходимо для формирования так называемой «пробки», чтобы закрыть место дефекта в сосудистой стенке. Усиленная активация тромбоцитов при патологии может приводить к избыточному тромбообразованию и наоборот, при замедлении агрегации могут возникать геморрагии. Существенную роль гемостаза играет взаимодействие эритроцитов с тромбоцитами и образование эритроцитарно-тромбоцитарных агрегатов [1]. Благодаря наличию молекул адгезии, эритроциты способны модулировать функцию тромбоцитов через физическое межклеточное взаимодействие. Увеличение вязкости крови связано с повышением количества и изменением формы эритроцитов. Их способность к агрегации приводит к увеличению вязкости крови при низких скоростях сдвига. Физиологическая агрегация эритроцитов является обратимой. В здоровом организме дезагрегация доминирует над агрегацией.

Исследования вязкоупругих свойств крови в процессе свертывания выполнены с применением метода НПТЭГ. Проведенные численные и лабораторные эксперименты показали, что он является эффективным методом оценки системы гемостаза, так как позволяет оценить всю совокупность этапов фибриногенеза и верифицировать гемостатический потенциал при различных клинических ситуациях.

В модельных условиях было показано, что выраженность агрегации эритроцитов зависит от того, какая скорость сдвига предшествует началу процесса измерения. Метод НПТЭГ позволяет сканировать процессы свертывания крови на различной частоте, а, следовательно, и по скоростям сдвига. В результате исследования было определено, что при частоте 359 Гц влияние плазменных характеристик крови на ее вязкость по сравнению с влиянием форменных элементов крови становится более заметным, чем при частоте 2975 Гц. Чем больше частота вынужденных колебаний иглы-резонатора, тем меньше величина амплитуды его сигнала. Увеличение скорости (частоты) способствует разрушению агрегатов. При частоте 359 Гц время релаксации крови к начальному состоянию после прохождения иглы-резонатора практически равно периоду колебаний иглы-резонатора. Следовательно, сигнал пьезоэлектрического датчика отражает изменение вязкости крови только вследствие процессов свертывания и не зависит от механического разрушения агрегатов.

Полученные результаты подтверждают возможность использования данного подхода к анализу вязкоупругих свойств цельной крови в режиме, максимально приближенном к исследованию *in vivo* [2]. Они могут быть использованы для оценки системы регуляции агрегатного состояния крови в клинической практике.

### Литература

1. Широкова Т.Е., Бурячковская Л.И., Сумароков А.Б. и др. Значение активации тромбоцитов и изменений эритроцитов в возникновении тромботических и реологических нарушений при ишемической болезни сердца // Кардиоваскул. терапия и профилактика. 2007. Т. 6. № 5. С. 18–24.
2. Демкин В.П., Мельничук С.В., Удут В.В. и др. Определение вязкоупругих характеристик цельной крови на основе метода низкочастотной пьезотромбоэластографии // Изв. высш. учеб. заведений. Физика. 2019. Т. 62. № 12. С. 55–62.

## ВЛИЯНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА СПЕКТР КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Ю. В. Зайцева

*Институт автоматики и электрометрии СО РАН, Новосибирск*

✉ [julmari3@mail.ru](mailto:julmari3@mail.ru)

### Аннотация

В работе исследованы особенности спектров комбинационного рассеяния света фосфолипидных мембран в области валентных  $\text{CH}_2$ -колебаний. Показано, что помимо структуры углеводородных хвостов и их конформационных состояний значительное влияние на спектры в этом частотном диапазоне оказывают межмолекулярные взаимодействия в бислое.

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) широко применяется для исследования липидных мембран, причём в основном из спектров КРС получают информацию о состоянии липидных хвостов. Однако некоторые линии в спектрах КРС проявляют чувствительность не только к упорядоченности хвостов отдельных молекул, но и к межмолекулярным взаимодействиям в бислое. Например, линии валентных  $\text{CH}_2$ -колебаний в частотном диапазоне  $2850\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ .

Обычно считается, что линия симметричных  $\text{CH}_2$ -колебаний слабо зависит от упорядоченности бислоя, а линия антисимметричных  $\text{CH}_2$ -колебаний реагирует как на конформационное разупорядочение липидных хвостов, так и на нарушения латерального порядка. В качестве параметра, характеризующего упорядоченность бислоя, используется отношение интенсивностей этих двух линий.

В данной работе были исследованы спектры комбинационного рассеяния света многослойных везикул насыщенного липида DPPC, а также смесей с дейтерированным липидом DPPC-d62. Вместо отношения интенсивностей линий антисимметричных и симметричных  $\text{CH}_2$ -колебаний интенсивности этих линий были измерены независимо, с использованием нормировки на линию  $\text{CN}$ -колебаний.

Показано, что при понижении температуры от 300 К до 100 К в спектрах DPPC интенсивность линии антисимметричных  $\text{CH}_2$ -колебаний растёт, а интенсивность линии симметричных  $\text{CH}_2$ -колебаний уменьшается. То есть обе линии проявляют чувствительность к упорядоченности липидного бислоя. При замещении половины липида на его дейтерированный аналог DPPC-d62 относительная интенсивность линии антисимметричных  $\text{CH}_2$ -колебаний не меняется, то есть она не чувствительна к подобному изотопному замещению. В то же время интенсивность линии симметричных  $\text{CH}_2$ -колебаний на низких температурах при изотопном замещении увеличивается. А значит, именно эта линия чувствительна к межмолекулярным взаимодействиям в бислое.

Таким образом, в работе показано, что по спектрам КРС на низких температурах можно независимо отследить нарушения конформационного и латерального порядка в липидном бислое.

---

**THE APPLICATION OF QUANTITATIVE METABOLOMICS  
FOR THE TAXONOMIC DIFFERENTIATION OF BIRDS\***E. A. Zelentsova<sup>1</sup>, L. V. Yanshole<sup>1</sup>, Yu. P. Tsentalovic<sup>1</sup>, K. A. Sharshov<sup>2</sup>, V. V. Yanshole<sup>1</sup><sup>1</sup>*ITC SB RAS, Russia*<sup>2</sup>*FGBNU "FRC FTM", Russia*

✉ zelentsova@tomo.nsc.ru

**Abstract**

Modern evolutionary biology offers a wide variety of methods to explore the evolution of species and to describe their relationships. The methods of DNA/RNA sequence analysis have been developing for decades and have become increasingly popular and reasonably reliable. Nevertheless, final phylogenetic trees for many taxa are still under debate because both classical and genomics-based approaches have their own limitations for phylogenetic tree reconstruction. Here, we propose the use of younger 'omics' methods, namely quantitative metabolomics, to aid the phylogeny reconstruction of vertebrates. We show that metabolomics-based hierarchical clustering analysis trees match, although not perfectly, to the genomics-based trees.

In the current pilot study, we propose the use of quantitative metabolomics to reconstruct the phylogeny of vertebrates, namely birds. We determined the concentrations of the 67 most abundant metabolites in the eye lenses of the following 14 species from 6 orders of the class Aves (Birds): the Black kite (*Milvus migrans*), Eurasian magpie (*Pica pica*), Northern raven (*Corvus corax*), Eurasian coot (*Fulica atra*), Godlewski's bunting (*Emberiza godlewskii*), Great crested grebe (*Podiceps cristatus*), Great tit (*Parus major*), Hawfinch (*Coccothraustes coccothraustes*), Hooded crow (*Corvus cornix*), House sparrow (*Passer domesticus*), Rock dove (*Columba livia*), Rook (*Corvus frugilegus*), Short-eared owl (*Asio flammeus*) and Ural owl (*Strix uralensis*). Further analysis shows that the statistical approaches generally used in metabolomics can be applied for differentiation between species, and the most fruitful results were obtained with hierarchical clustering analysis (HCA). We observed the grouping of conspecific samples independently of the sampling place and date. The HCA tree structure supports the key role of genomics in the formation of the lens metabolome, but it also indicates the influence of the species lifestyle. A combination of genomics-based and metabolomics-based phylogeny could potentially resolve arising issues and yield a more reliable tree of life.

---

\*This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 21-74-00068.  
© E. A. Zelentsova, L. V. Yanshole, Yu. P. Tsentalovic, K. A. Sharshov, V. V. Yanshole, 2022

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОЛУКАНАЛОВ $F_0F_1$ -АТФ-СИНТАЗЫ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Л. А. Ивонцин, Е. В. Машковцева, Я. Р. Нарциссов

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва

✉ ivontsin@icmph.ru

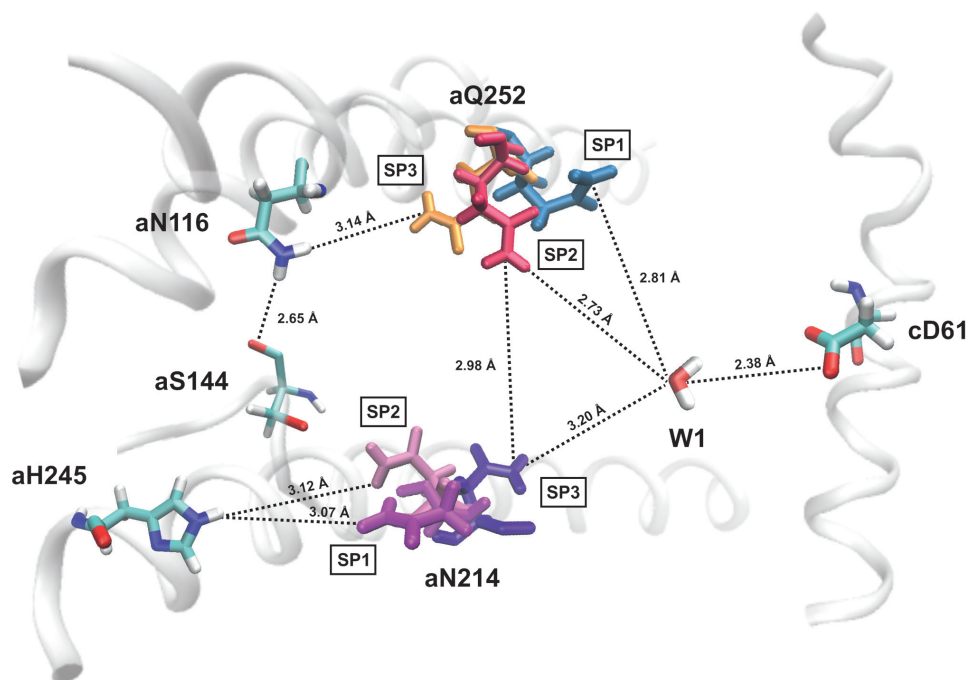
### Аннотация

Для изучения структурных особенностей протонных полуканалов  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы было проведено молекулярно-динамическое моделирование. Описана сеть полярных аминокислотных остатков и области локализации молекул воды, которые оказывают существенное влияние на транспорт протонов. Оценено влияние кардиолипинов на структурную динамику радикалов аминокислот и гидратацию фермента.

Одной из частых причин возникновения патологических состояний является энергодефицит тканей организма. Ведущую роль в образовании аденозинтрифосфата (АТФ), основного источника энергии в клетке, играет митохондриальный белковый комплекс  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза, использующий электрохимический градиент ионов водорода. Одним из важнейших процессов в каталитическом цикле фермента является перенос протонов через мембранный фактор  $F_0$  по двум несоосным полуканалам. Однако структура полуканалов все еще неизвестна, и оценка параметров протонного транспорта затруднена. Тем не менее универсальность молекулярного механизма позволяет получать информацию о процессе при изучении фермента из разных организмов.

Для изучения структурных особенностей протонных полуканалов было проведено молекулярно-динамическое моделирование мембранной части  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы из *E. Coli* [PDB ID: 6VWK], встроенной в липидный бислой и водную среду. Была исследована структурная динамика радикалов аминокислот, а также гидратация белка. Описана сеть полярных аминокислотных остатков и молекул воды, которые оказывают существенное влияние на транспорт протонов.

Во входном полуканале были обнаружены две водные лакуны, через которые протон может проникать внутрь фермента и достигать Asp61 *c*-субъединицы через высококонсервативную цепь переноса протона, включающую существенные аминокислотные остатки и три структурные молекулы воды (W1-W3), области лока-



Пространственные положения радикалов *a*Asn214 и *a*Gln252



лизации которых были определены в результате кластерного анализа. Также мы обнаружили стабильные пространственные положения (SP1-SP3) радикалов Asn214 и Gln252  $\alpha$ -субъединицы (см. рисунок). Установлено, что  $\alpha$ Asn214 в положении SP3 и  $\alpha$ Gln252 в SP1, SP2 были ориентированы в сторону  $c$ Asp61 и могли протонировать его через кластер молекул воды W1. При этом в положении SP1  $\alpha$ Asn214 был ориентирован в сторону  $\alpha$ His245, поэтому цепь переноса протона всегда была незамкнута и вероятность нахождения  $\alpha$ Asn214 в положении SP1 или SP3 будет определять время протонного транспорта. Выходной полуканал представлял собой просто водную лагуну, через которую протон мог легко перемещаться *in bulk* [1]. Кроме того, наличие в мембране кардиолипинов оказывало существенное влияние на гидратацию полуканалов.

Полученная в работе сеть полярных аминокислотных остатков и молекул воды позволит провести моделирование траекторий движения протона через мембранную часть белка с учетом всех внешних полей, а также послужит основой для интерпретации исследований по сайт-специфическому мутагенезу.

### Литература

1. Ivontsin L.A., Mashkovtseva E.V, Nartsissov Y.R. Insights on the proton translocation pathways in  $F_0F_1$ -ATP synthase using molecular dynamics simulations // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2022. V. 717. P. 109135.

**COMPARISON OF BACTERIA PHOTOINACTIVATION MECHANISMS AT PULSED EXCITATION**

A. T. Ishemgulov, S. N. Letuta, D. E. Tsurko, D. V. Dorofeev

*Orenburg State University, Russia*

✉ azamat.ischemgulov@yandex.ru

**Abstract**

This study compares different mechanisms of inactivation of planktonic bacteria in the case of pulsed excitation in the presence of a sensitizer. It is shown that the photodynamic activity of the sensitizer has a rather low efficiency in comparison with thermal mechanisms.

Photoinactivation of bacteria using sensitizers and various light sources is one of the alternatives to traditional antibiotics. Previously, it was shown [1, 2] that the possible mechanisms of photodegradation of planktonic bacterial cultures can be: (1) photodynamic action of reactive oxygen species; (2) direct hyperthermia with local transformation of excitation energy into heat; (3) when transferring energy to a medium with subsequent generation of shock waves (pulsed light sources of high power density are required). In the present study, the contribution of these mechanisms to the destruction of planktonic bacteria in the presence of sensitizing molecules was evaluated. The objects of the study were strains of *Salmonella typhimurium* LT2 and *Staphylococcus aureus*. Eosin and rhodamine C were used as sensitizers. Eosin binds poorly to bacterial walls, but has a high yield to the triplet excited state and also known as effective ROS generator. Rhodamine C is a cation. It binds well to bacterial walls, but practically does not act as the ROS generator. A pulsed solid-state YAlG:Nd laser served as the powerful light source, excitation power density was controlled within the range of 0.1–20 MW/cm<sup>2</sup>. Bacterial inactivation was assessed by colony forming unit count, dynamic light scattering, and scanning electron microscopy data.

It has been established that the mechanism of bacterial inactivation depends on the photodynamic activity of the dye and the degree of aggregation of dye molecules at bacterial walls. If the sensitizer does not bind to bacteria, but has a high yield to the triplet state, then the main mechanism of bacterial destruction in the irradiation zone is the action of ROS. With an increase in the excitation power density, the role of shock waves, which are formed as a result of two-quantum absorption and the population of high electronic states of molecules, increases. If the sensitizer does not generate ROS, but binds to bacteria, then the main mechanism of cell death is direct heating, and with an increase in the excitation power density, also shock waves. Efficiency of the photodynamic mechanism strongly depends on the oxygen content in the medium, while the thermal mechanism and shock waves require only good light penetration into the medium. Decrease in the activity of bacteria in our experiments was observed even in those areas where the excitation light did not penetrate. In this case, only shock waves can be the only damaging agent; therefore, this mechanism of bacterial inactivation in solutions can work in the case of insufficient penetration of light or oxygen into the medium. The results obtained may be useful in the development of new antibacterial methods.

**References**

1. Letuta S.N. et al. Inactivation of Planktonic Microorganisms by Acoustic Shock Waves // Russ. J. Phys. Chem. 2021. V. 95. P. 848–854.
2. Letuta S.N. et al. Mechanisms of Damage in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon Pulse Photoexcitation of Molecular Sensitizers // Biophysics. 2022. V. 67. P. 419–426.

## ВЛИЯНИЕ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВОГО МОДИФИКАТОРА НА КЛЕТОЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ ПЕПТИДА TYR-ARG-PHE-LYS\*

Р. А. Ишкаева, А. Рагад, А. В. Лайков, Р. И. Гарифуллин, М. И. Камалов, Д. В. Салахиева, Т. И. Абдуллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ r.a.ishkaeva@gmail.com

### Аннотация

Синтезирован ряд олигопептидов на основе мотива Tyr-Arg-Phe-Lys и их конъюгаты с трифенилфосфониевыми группами. Исследовано влияние модификатора на внутриклеточное проникновение олигопептидов и их взаимодействие с митохондриями.

Биоактивные олигопептиды (ОП) являются перспективной основой для создания терапевтических препаратов, однако по природе ОП обладают плохими фармакокинетическими свойствами, в частности, проникновением через клеточные мембраны. Объектами настоящего исследования явились амфипатические катионные ОП на основе биоимитирующего мотива Tyr-Arg-Phe-Lys, представляющие интерес в качестве цитопротекторных препаратов для терапии дегенеративных заболеваний. Целью исследования было выяснить возможность улучшения фармакокинетических свойств подобных ОП посредством их модификации трифенилфосфониевым (ТФФ) катионом, принимая во внимание противоречивые данные о влиянии ТФФ групп на свойства различных ОП (по сравнению с другими природными соединениями). Методом твердофазного синтеза получен ряд производных Tyr-Arg-Phe-Lys; структура ОП охарактеризована ВЭЖХ-масс-спектрометрическим методом (LC-MS/MS).

Также с использованием LC-MS/MS в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) исследовано внутриклеточное накопление исходного ОП и его ТФФ конъюгатов с разной длиной алкильного линкера. Клетки глиобластомы человека SNB-19 инкубировали в присутствии ОП с последующей промывкой и лизисом. Содержание ОП в клеточных лизатах определяли с помощью программы MultiQuant 3.0.2 по площади пиков для выбранных MRM-переходов, которые в случае исходного ОП составили  $m/z$  306,7  $\rightarrow$  129,0 и  $m/z$  306,7  $\rightarrow$  320,0.

Установлено, что ТФФ-группы более чем в 10 раз повышают внутриклеточное накопление Tyr-Arg-Phe-Lys, при этом ТФФ-конъюгаты достигают микромолярных концентраций в клетке. Результаты показывают транспортирующий эффект ТФФ-групп в отношении исследуемого тетрапептида, который выявлен без использования флуоресцентных меток, способных изменять клеточную доступность ОП. Оптимизированная методика анализа ТФФ-конъюгатов ОП методом LC-MS/MS может быть использована при проведении дальнейшего исследования их эффектов *in vivo*.

Дополнительно с использованием флуоресцентных зондов установлено, что ТФФ-группы усиливают модулирующий эффект ОП на митохондриальную мембрану, при этом ТФФ-конъюгаты не обладают деполяризующим и прооксидантным действием, а также не ингибируют жизнеспособность клеток млекопитающих.

### Литература

1. Akhmadishina R., Garifullin R., Petrova N. et al. Triphenylphosphonium moiety modulates proteolytic stability and potentiates neuroprotective activity of antioxidant tetrapeptides *in vitro* // *Frontiers in Pharmacology*. 2018. V. 9. P. 1–13.
2. Szeto H. H. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants // *The AAPS Journal*. 2006. V. 8(2). P. E277–E283.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-10105) и с использованием оборудования Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ.

© Р. А. Ишкаева, А. Рагад, А. В. Лайков, Р. И. Гарифуллин, М. И. Камалов, Д. В. Салахиева, Т. И. Абдуллин, 2022

## MODELING INFECTION CAUSED BY MULTIDRUG RESISTANT *P. AERUGINOSA* IN AGE-SYNCHRONOUS POPULATIONS OF *C. ELEGANS*\*

A. I. Kalganova, A. D. Mikushina, I. E. Eliseev

*Alferov University, St. Petersburg*

✉ eliseev@spbau.ru

### Abstract

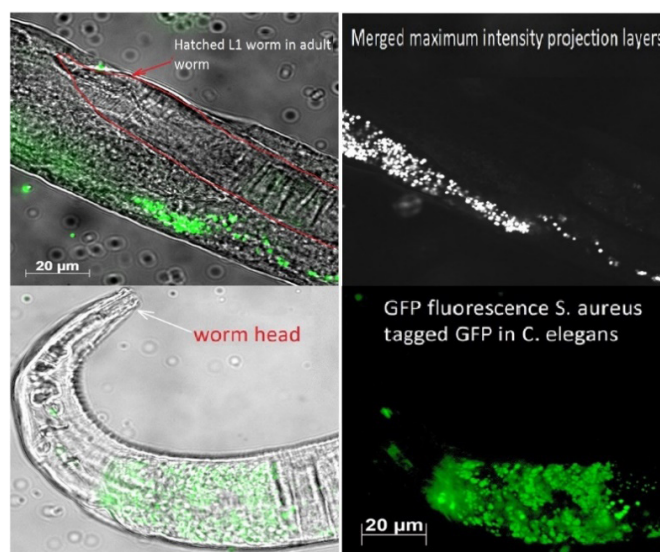
Existing antibiotic discovery platforms do not allow assessment of toxicity and effects on virulence factors. Ideally, drug screening should be performed *in vivo* using a whole-animal infection model. Here we show the practical application of the *C. elegans* as a system for screening antibiotics *in vivo*. We focus on assay development and adaption to various *P. aeruginosa* strains. The model can be applied to study the synergy of antimicrobial peptides and antibiotics.

The spread of bacterial resistance to antibiotics is a major public health problem. New platforms for antimicrobials discovery are urgently needed. The antimicrobial activity of drugs usually assessed on pathogen cultures *in vitro*, which does not allow considering specific host-pathogen interactions. It was proposed to use nematodes *C. elegans* for testing, since they are infected by all ESCAPE pathogens [1, 2].

Therefore, we aim to study the activity of antimicrobial peptides and antibiotics in an infection model in this organism. We analyzed many strains of ESCAPE pathogens, including multidrug resistant ones, for the formation of a lethal infection in *C. elegans*. We have adapted published nematode infection protocols [3] for pathogens *P. aeruginosa* and *S. aureus*, both standard laboratory strains (ATCC 27853 and ATCC 25923) and clinical isolates with multiple antibiotic resistance *P. aeruginosa* MDR 522/17 and *S. aureus* MDR 1399/2017 (Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg).

Three most interesting strains have been identified that form an infection in *C. elegans* P.a. MDR 522/17, P. a. Ps1, S. a. GFP (the two latter received from the Institute of Bioorganic Chemistry RAS). The formation of an intractable bacterial population in *C. elegans* was demonstrated on the S. a. GFP strain (see figure below). However, the infection with S. a. GFP and P. a. MDR 522/17 do not form the necessary rapid lethal infection.

We conceived to use an aged synchronous population (6 days after L4) since old nematodes do not have such a range of resistances to stimuli as young worms [4]. Indeed, under these conditions it was possible to form a lethal infection in *C. elegans* with P. a. MDR 522/17. The P. a. Ps1 was the most pathogenic and caused lethal infection in both young and aged nematodes. The course of ongoing infection was analysed by measuring the survival curves of infected nematodes in 384-well plates for one week after exposure to the pathogen. We used different methods for detecting live/dead animals using image analysis, fluorescent signal from vital dye, and real-time experimental observation [5].



Visualization of bacterial infection by confocal microscopy.  
Nematodes were infected with a GFP tagged *S. aureus*

\* This study was funded by the Russian Science Foundation (grant № 22-24-20120, <https://rscf.ru/project/22-24-20120/>) and co-funded by the city of St. Petersburg.

Having developed a platform for *C. elegans* infection, we moved on to their “treatment”. In experiments with drug-susceptible laboratory strains, we observed efficacious treatment with ampicillin, kanamycin, and tetracycline. Animals treated with antibiotics showed a lifespan almost indistinguishable from the control. Nematodes infected with drug-resistant pathogens did not respond to treatment. As an alternative, we studied the effect of antimicrobial peptide protegrin 1 at various concentrations on the old synchronous pathogen-infected population of *C. elegans* and found the optimum between efficiency and low toxicity.

Next, we plan to investigate the synergy between antimicrobial peptides and antibiotics in the *in vivo* model that we have recently demonstrated *in vitro* [6]. It is expected that this synergy may be even more pronounced, since alternative mechanisms of action, not related to the direct destruction of bacteria, can be observed in the whole animal model.

### References

1. Powell, Jennifer R., and Frederick M. Ausubel 2008. *Methods in Molecular Biology*. 415, 403-427.
2. Balla, K. M., & Troemel, E. R. 2013. *Cellular microbiology*. 15(8), 1313-22.
3. Moy, Terence I., et al. 2009. *ACS Chemical Biology*. 4 (7), 527-533.
4. Tan M. W., Mahajan-Miklos S., Ausubel F. M. 1999. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(2), 715-720.
5. Moy, Terence I., et al. 2006. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(27), 10414-19.
6. Zharkova, Maria S., et al. 2019. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 9, 128.

## СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ СТЕАРАТОВ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ СПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ АДДУКТОВ ГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА С ХЛОРСОДЕРЖАЩИМИ КСЕНОБИОТИКАМИ

Я. К. Калниня<sup>1</sup>, А. С. Гладчук<sup>1,2</sup>, Е. П. Подольская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-клинический центр токсикологии им. С. Н. Голикова  
Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург

✉ kln.yana.k@gmail.com

### Аннотация

Оптимизирована методика получения сорбционных материалов на основе стеаратов различных металлов для специфичной металл-аффинной экстракции продуктов вторичного метаболизма хлорсодержащих ксенобиотиков. Охарактеризован процесс формирования мультимолекулярных структур, подобраны параметры для получения сорбентов и проведения металл-аффинной экстракции на МАЛДИ-мишени. Проведена апробация методики на лекарственном препарате диклофенак.

Принцип металл-аффинной хроматографии (МАХ) основывается на различном сродстве органических соединений к ионам металлов, при этом входящий в состав сорбента металл можно выбирать в зависимости от конкретной задачи эксперимента, основываясь на его способности образовывать координационные связи с их функциональными группами. Закрепление сорбционных материалов на поверхности твердофазной матрицы позволяет повысить экономичность, эффективность и чувствительность анализа. В настоящее время такой подход активно используется при решении задач фосфопротеомики, однако для исследования пептидов, модифицированных галогенсодержащими соединениями, МАХ ранее не применялась. Многие хлорсодержащие органические соединения, попадая в организм, быстро связываются с различными биогенными веществами-мишенями, что может определять их как токсическое, так и терапевтическое воздействие. Соответственно, представляется перспективным, с одной стороны, диагностировать отравления этими токсикантами по наличию долгоживущих аддуктов с белками крови, которые могут рассматриваться как маркеры интоксикации. А с другой, идентификацию аддуктов можно рассматривать как способ выявления реактивных метаболитов при моделировании биотрансформации ксенобиотиков.

Для этого на поверхности мишени МАЛДИ были сформированы структуры на основе монослоев стеаратов металлов, в состав которых входили Cu, Ni, Co, Fe, In, Ga, Eu, La. Морфология полученных сорбентов была исследована с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии. Было показано, что структуры обладают развитой поверхностью.

Условия сорбции исследовали на примере аддуктов глобина человека с модельным алкилятором, N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамидом, структурное звено которого схоже со многими лекарственными средствами. Сорбция проводилась в кислой (0,1 % водная ТФУ), нейтральной (вода) и щелочной (2,5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) средах. Наилучших результатов удалось достичь в нейтральной среде, в этом случае наблюдался максимальный выход ионов аддуктов во время масс-спектрометрического анализа и, как следствие, в масс-спектре наблюдались наиболее интенсивные сигналы целевых соединений при минимальном количестве сигналов нецелевых компонентов. Наиболее высокий уровень как специфичности, так и селективности продемонстрировали сорбенты, содержащие лантаноиды.

Затем была осуществлена апробация методики на диклофенаке (DCL), являющемся маркером антропогенного загрязнения окружающей среды. Моделирование биотрансформации DCL проводили с использованием УФ-индуцированного фотокаталитического окисления в присутствии наночастиц  $\text{TiO}_2$  (УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО). Полученные метаболиты были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения и хорошо согласовывались с литературными данными. Продукты УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО DCL затем инкубировали с глобином человека, после чего проводили триптический гидролиз и металл-аффинную экстракцию на сорбентах, представленных выше. Были получены линейные масс-спектры глобина человека, подтверждающие наличие модификации в альфа- и бета-субъединицах, а также спектры триптических гидролизатов глобина до и после проведения экстракции. На спектрах, полученных до проведения металл-аффинной экстракции, сигналы, принадлежащие аддуктам глобина человека с продуктами окисления DCL, незначительно превышали уровень шума, но после проведения экстракции на всех сорбентах присутствовали сигналы, соответствующие расчетным аддуктам. Как и в случае с модельным веществом, лучшие результаты были достигнуты для сорбентов, содержащих лантаноиды.

Таким образом, в результате работы было показано, что экстракция на металл-аффинных сорбентах, сформированных на поверхности МАЛДИ-мишени, является эффективной стадией пробоподготовки при исследовании аддуктов белков с хлорсодержащими соединениями.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ САМООГРАНИЧЕННЫХ РНК-КОМПЛЕКСОВ\***М. А. Канарская<sup>1,2</sup>, А. А. Ломзов<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ makanarskaya@gmail.com

**Аннотация**

Вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот во многом определяют и биологические функции. В ИХБФМ СО РАН исследуют разнообразие вторичных и третичных структур комплексов олигонуклеотидов и их свойства. В частности, была показана возможность формирования самоограниченных циклических структур парной олигонуклеотидов. Такие структуры можно получить, если взять две пары комплементарных НК-последовательностей, формирующих два дуплекса, и соединить их в один комплекс двумя линкерами [1].

Целью данной работы является исследование физико-химических свойств РНК, способных формировать самоограниченные комплексы.

Объектом исследования являлись короткие синтетические последовательности РНК — олигонуклеотиды, состоящие из 10 звеньев, способных формировать дуплексные участки, которые соединены нуклеотидными линкерами различной длины. Проведено исследование влияния размера линкера в цепях олигомеров на тип и физико-химические свойства формируемых ими комплексов.

Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала исследована термическая стабильность одиночных цепей и межмолекулярных комплементарных комплексов. Для анализа структуры использован метод гельэлектрофореза в неденатурирующих условиях.

Показано, что комплекс РНК/РНК формируется эффективно, при этом отдельные цепи РНК способны формировать самокомплементарные комплексы. Исследование показало, что выбранные пары олигонуклеотидов способны формировать самоограниченные или конкатамерные комплексы. Установлено, что размер линкеров в олигонуклеотидах влияет на тип формируемых ими структур, а также на размер самоограниченных комплексов: бимолекулярные, тетрамолекулярные, гексамолекулярные и более высокомолекулярные. Полученные результаты для РНК-комплексов сопоставимы с результатами аналогичных исследований для цепей ДНК [1].

**Литература**

1. Zamoskovtseva A. A. et al. Pairing nanoarchitectonics of oligodeoxyribonucleotides with complex diversity: concatemers and self-limited complexes // RSC advances. 2022. Т. 12. № 11. С. 6416–6431.

\* Работа выполнена при поддержке проектов РФФИ 20-04-0719 и Государственного задания ИХБФМ СО РАН № 12111290021.

© М. А. Канарская, А. А. Ломзов, 2022

## ДОСТАВКА ДНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩЕЙ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН (RBD) SARS-COV-2, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ *IN VIVO*\*

Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

✉ def\_2003@mail.ru

### Аннотация

Метод электропорации является одним из перспективных способов доставки ДНК-вакцин. Оптимизация условий электропорации была проведена с использованием модельной плазмиды rhMGFP. Оптимизированный протокол был использован для иммунизации мышей ДНК-вакциной pVAXrbd, кодирующей рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2. Введение pVAXrbd лабораторным животным методом электропорации значительно усиливало как гуморальный, так и клеточный специфический иммунный ответ, по сравнению с внутримышечным введением «голой» ДНК-вакцины.

Средства профилактики на основе нуклеиновых кислот представляют собой перспективную платформу для разработки вакцин, в том числе против COVID-19. Ранее нами была разработана ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2. Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин обычно используют различные способы доставки, среди которых перспективным методом является электропорация.

Целью данной работы был выбор оптимального протокола электропорации с использованием модельной плазмиды rhMGFP и использование выбранного протокола для оценки иммуногенности ДНК-вакцины pVAXrbd.

Подбор оптимальных параметров осуществлялся по двум критериям: патогистологические изменения и оценка флуоресценции GFP. После электропорации *in vivo* патогистологию и флуоресценцию белка GFP оценивали на 2-е сутки путем анализа среза мышечной ткани с помощью светового (Imager Z1) и флуоресцентного (Olympus) микроскопа. На основании количественного определения экспрессии GFP в срезах мышц мышей линии BALB/c с использованием введённой нами относительной величины количества волокон, экспрессирующих зелёный флуоресцентный белок, можно говорить об успешном биосинтезе белка с плазмидной ДНК (rhMGFP).

Исходя из данных критериев был выбран оптимальный протокол электропорации с параметрами: постоянный ток прямоугольной формы прямой и обратной полярности тремя импульсами, напряжением 12 вольт в течение 30 мс и интервалом 950 мс, с ограничением по току 45 мА. С применением полученного протокола иммунизировали мышей BALB/c двукратно с интервалом в три недели дозой 100 мкг pVAXrbd.

Эффективность доставки pVAXrbd оценивали с помощью ИФА по определению уровня RBD-специфических антител, с помощью метода вируснейтрализации с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 и метода ELISpot IFN- $\gamma$ .

В сыворотках животных, иммунизированных pVAXrbd+EP, титры антител достигали 1 : 109350, что в 16 раз выше, чем в группе животных, получавших «голую» ДНК-вакцину только в/м (титры 1 : 6750). При этом сыворотки продемонстрировали способность нейтрализовать штамм SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 в культуре клеток *in vitro* в реакции вируснейтрализации. Средний нейтрализующий титр сывороток мышей из группы pVAXrbd + EP составлял 1 : 466, что значительно выше, чем титры сывороток мышей из группы pVAXrbd (1 : 23).

ELISpot-анализ IFN- $\gamma$  показал, что наибольшее количество клеток (2434 пятна/млн спленоцитов), продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию пулом пептидов RBD, зарегистрировано в группе животных, иммунизированных pVAXrbd методом электропорации. Для сравнения в контрольной группе количество клеток было в 6,5 раза меньше и составило 380 пятен/млн спленоцитов.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что введение ДНК-вакцины pVAXrbd лабораторным животным методом электропорации значительно усиливает как гуморальный, так и клеточный специфический иммунный ответ по сравнению с внутримышечным введением ДНК-вакцины.

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).



## ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДНК-ВАКЦИНОЙ pVAX-RBD С ПОМОЩЬЮ СТРУЙНОЙ ИНЖЕКЦИИ\*

Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко

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

✉ orlova.lyub1996@yandex.ru

### Аннотация

Введение ДНК-вакцины с помощью безыгольного инжектора является привлекательным методом доставки, благодаря простоте применения и безопасности. Был отработан метод доставки pVAXrbd, кодирующей рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2, с помощью струйного инжектора. Проведена сравнительная оценка гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных pVAXrbd с помощью в/к введения и с помощью инъекции.

Распространение SARS-CoV-2 стимулировало выход на рынок новых вакцин, в том числе на основе нуклеиновых кислот мРНК и ДНК. Основным недостатком ДНК-вакцин является их низкая иммуногенность при в/м введении в виде «голой» ДНК. Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин был опробован широкий спектр стратегий, включая упаковку в липосомы, поликатионные полимеры, доставку генной пушкой, электропорацию и безыгольный инжектор. Введение ДНК-вакцины с помощью безыгольного инжектора является очень привлекательным методом доставки благодаря простоте применения и безопасности.

Ранее нами была разработана ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2.

Цель исследования — отработать метод доставки pVAXrbd с помощью струйного инжектора, а также провести сравнительную оценку гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных pVAXrbd с помощью в/к введения и с помощью инъекции.

В работе использовали безыгольный инъекционный пистолет HYALURON PEN XY PLUS, China. Для снижения болевого синдрома применялся ингаляционный наркоз животных с применением 2,5 % изофлурана. Плазмиду pVAXrbd в количестве 90 мкг, растворенную в буфере PBS в объёме 50 мкл, вводили в заднюю бедренную мышцу мышей линии Balb/c с весом 16–18 г путем инъекции внутривенно. Мышей сначала помещали в индукционную камеру, а затем перемещали под наркозные маски. Волосы удаляли с волосистой части лапы с помощью геля для депиляции. Перед процедурой инъекции кожу обрабатывали 70 % этанолом.

Эффективность доставки pVAXrbd оценивали с помощью ИФА по определению уровня RBD-специфических антител на 14-е и 21-е сутки после инъекции. На 14-е сутки после процедуры инъекции с помощью ИФА определены титры антител в сыворотках животных, иммунизированных pVAXrbd, достигающие 1 : 4515, что в 40 раз выше, чем в группе животных, получивших «голую» ДНК-вакцину только в/к (титры 1 : 113). Через 21 день после процедуры инъекции титр антител снизился и составил 1 : 750, что в 10 раз выше, чем в группе животных, получивших «голую» ДНК-вакцину только в/к (титры 1 : 75).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что введение ДНК-вакцины pVAXrbd лабораторным животным методом инъекции существенно увеличивает гуморальный иммунный ответ по сравнению с внутривенным введением ДНК-вакцины с помощью иглы.

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

## ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ФДТ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ СТ26

В. В. Клименко, Ан. А. Богданов, Н. А. Князев, В. М. Моисеенко, А. А. Богданов

*Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр  
специализированных видов медицинской помощи (онкологический)*

✉ klimenko.vova@gmail.com

### Аннотация

Фотодинамическая терапия (ФДТ) оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки за счет генерации синглетного кислорода. Истощение молекулярного кислорода в опухолевой ткани является лимитирующим фактором для противоопухолевого воздействия ФДТ по всей толщине ткани [1]. Трехмерные опухолевые сфероиды являются моделью опухолевой ткани с ограниченным притоком кислорода [2–4]. Целью данной работы было определение влияния параметров лазерного излучения при ФДТ на ингибирование роста опухолевых сфероидов СТ26.

### Материалы и методы

В работе использовалась клеточная линия мышинной аденокарциномы толстой кишки СТ26. Клетки культивировались в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в среде RPMI-1640 с 10 % бычьей сыворотки и антибиотиком пенициллин/стрептомицин. Опухолевые сфероиды были сформированы из 1000 клеток СТ26 и культивировались в течение пяти дней в 96 луночных круглодонных планшетах с поверхностью, обработанной материалом с низкой адгезией (96 well round bottom plate ULA, Corning, USA). Опухолевые сфероиды диаметром 500–600 мкм инкубировались с фотосенсибилизатором «Радахлорин» при концентрации 5 мкг/мл. ФДТ проводилась через 24 часа с помощью лазера Лахта-Милон ФДТ 662 нм при непрерывном и импульсном режимах облучения.

### Результаты

Выявлено, что снижение средней плотности мощности с 50 мВт/см<sup>2</sup> до 12,5 мВт/см<sup>2</sup> при непрерывном режиме ФДТ с дозой облучения 15 Дж/см<sup>2</sup> приводит к увеличению области повреждения опухолевых сфероидов СТ26 по глубине с 60 мкм до 130 мкм. Экспериментальное сравнение импульсного и непрерывного режимов облучения показало, что максимальное торможение роста сфероидов СТ26 наблюдается при импульсном режиме облучения с плотностью мощности 50 мВт/см<sup>2</sup>, длительность импульсов 200 мс и периодом повторения 800 мс.

### Выводы

Использование импульсного режима ФДТ позволило подавить рост опухолевых сфероидов СТ26 за счет реоксигенации пролиферирующей области клеток во время лазерного облучения.

### Литература

1. Foster T.H., Hartley D.F., Nichols M.G., Hilf R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids // Cancer research. 1993. Т. 53. № 6. С. 1249–1254.
2. Evans C.L. Three-dimensional in vitro cancer spheroid models for photodynamic therapy: strengths and opportunities // Frontiers in Physics. 2015. Т. 3. С. 15.
3. Mathews M.S., Angell-Petersen E., Sanchez R. et al. The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids // Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. 2009. Т. 41. № 8. С. 578–584.
4. Millard M., Yakavets I., Piffoux M. et al. mTHPC-loaded extracellular vesicles outperform liposomal and free mTHPC formulations by an increased stability, drug delivery efficiency and cytotoxic effect in tridimensional model of tumors // Drug Delivery. 2018. Т. 25. № 1. С. 1790–1801.

## НАНОЧАСТИЦЫ PLGA С 1,2-ДИКАРБОЛЛИДОМ КОБАЛЬТА ДЛЯ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

М. А. Клименко<sup>1,3</sup>, И. Б. Сиваев<sup>2</sup>, В. И. Брегадзе<sup>2</sup>, М. Б. Сокол<sup>1</sup>,  
Н. Г. Яббаров<sup>1</sup>, М. Р. Моллаева<sup>1</sup>, М. В. Чиркина<sup>1</sup>, Е. Д. Никольская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва

<sup>3</sup>Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

✉ elenanikolskaja@gmail.com

### Аннотация

Бор-нейтронозахватная терапия — перспективный метод лечения онкозаболеваний. Разработка новых наноразмерных средств доставки позволит достичь концентрации изотопа  $^{10}\text{B}$  в клетках опухоли, необходимой для облучения потоком нейтронов. Получение новых систем доставки является перспективным направлением, позволяющим увеличить концентрацию препарата в опухолевых клетках. Наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) являются перспективными системами доставки для различных видов терапии онкологических заболеваний, в том числе и для БНЗТ. Оптимизация процесса получения наночастиц с заданными параметрами для более эффективной терапии — востребованная задача для исследователей. Планы Бокса–Бенкена позволяют проводить анализ полученных данных и прогнозировать наилучшие параметры для получения частиц. В данной работе по планам Бокса–Бенкена из ранее составленных матриц и полученных по ним результатам (наночастицы) были определены условия получения наночастиц PLGA с 1,2-дикарболлидом кобальта с максимальным теоретическим общим содержанием препарата 1,3 % масс. и минимальным средним диаметром 64 нм, также были проведены эксперименты по оптимизации выбранных условий.

Метод бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ) основан на поглощении стабильным изотопом  $^{10}\text{B}$  нейтрона с образованием  $^7\text{Li}$  и альфа-частицы с высокой энергией, достаточной для уничтожения опухолевой клетки. Однако для успешного проведения терапии концентрация бора на грамм опухоли должна составлять  $\sim 20$  мкг. Достижение необходимой концентрации можно с помощью наноразмерных систем доставки. Интерес представляют наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) благодаря своей биосовместимости и биodeградируемости.

Для синтеза наночастиц PLGA был выбран 1,2-дикарболлид кобальта (рис. 1) ввиду большого количества атомов бора в его составе и гидрофильным свойствам.

Наночастицы получали методом двойных эмульсий, варьируя количество полимера — PLGA, соотношение органической фазы — хлороформа, и концентрацию стабилизатора эмульсии — поливинилового спирта (PVA), при различных соотношениях действующего вещества (1,2-дикарболлида кобальта) к полимеру. С помощью планов Бокса–Бенкена были построены плоскости зависимости общего содержания вещества (DL) и среднего диаметра полученных наночастиц от варьируемых параметров (рис. 2).

Анализ диаграммы, построенной по проведенной серии экспериментов, позволил определить оптимальные условия для получения наночастиц с максимальным общим содержанием действующего вещества — 1,3 % масс. и наименьшим средним диаметром — 64 нм. Полученные параметры наночастиц являются оптимальными для проведения эффективной БНЗТ, а дальнейшие эксперименты на биологических моделях *in vitro* и *in vivo* позволяют подобрать режимы введения препарата и дозы.

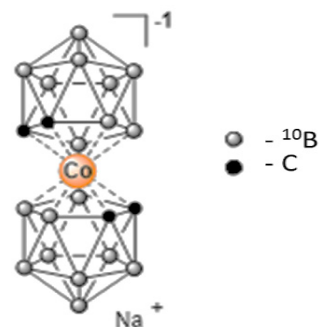


Рис. 1. Структурная формула 1,2-дикарболлида кобальта

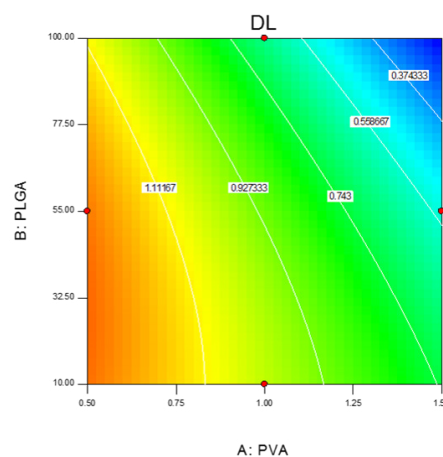


Рис. 2. Двухмерная диаграмма поверхности отклика общего содержания 1,2-дикарболлида кобальта при варьировании концентрации PVA и количества PLGA при заданном количестве хлороформа

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИШЕМИИ НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЮ БЫСТРЫХ НАТРИЕВЫХ И МЕДЛЕННЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЙ ПЕРИОД ПРИ КОРОНАРНОМ ШУНТИРОВАНИИ

С. Г. Коваленко<sup>1,2</sup>, Ш. Р. Фролова<sup>1,2</sup>, М. А. Попов<sup>3</sup>, Д. В. Шумаков<sup>3</sup>, Д. И. Зыбин<sup>3</sup>, К. И. Агладзе<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория биофизики возбудимых систем МФТИ, Долгопрудный

<sup>2</sup>Лаборатория молекулярно-клеточной диагностики МОНИКИ, Москва

<sup>3</sup>Отдел хирургии сердца и сосудов МОНИКИ, Москва

✉ sandaara.romanova@phystech.edu

### Аннотация

Исследовано влияние кардиоплегического раствора Кустодиол на потенциалзависимые ионные каналы кардиомиоцитов, полученных из хирургических образцов правого предсердия человека, путем сравнения электрофизиологических свойств быстрых натриевых каналов и медленных калиевых каналов до и после операции по коронарному шунтированию с помощью электрофизиологического метода пэтч-кламп.

При операциях на открытом сердце использование кардиоплегического раствора в сочетании с гипотермией позволяет избежать глобальной ишемии сердца [1]. Однако наблюдаются послеоперационные осложнения в виде аритмий [2]. В данной работе исследуется один из возможных факторов послеоперационных аритмий — влияние кардиоплегического раствора Кустодиол на потенциалзависимые ионные каналы кардиомиоцитов человека. Целью работы является сравнение электрофизиологических характеристик быстрых натриевых каналов  $I_{Na_v}$  и медленных калиевых каналов  $I_Ks$  зрелых кардиомиоцитов человека, полученных из биоптата правого предсердия человека, до введения и после отмыва кардиоплегического раствора Кустодиол методом пэтч-кламп.

Зрелые кардиомиоциты человека выделены из биоптата правого предсердия с помощью оптимизированного протокола в условиях лаборатории [3]. Всего рассмотрено три группы данных с биоптатов: взятые до введения кардиоплегического раствора в сердце (PP1), после введения кардиоплегического раствора на операции с последующим отмывом в условиях лаборатории (PP2) и после восстановления сердечного ритма пациента (PP3). Токи  $I_{Na_v}$  и  $I_Ks$  записаны методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» с добавлением перфорирующего агента. Протокол стимуляции для  $I_{Na_v}$  задан в виде ступенек от  $-80$  мВ до  $+15$  мВ с шагом в  $5$  мВ длительностью в  $100$  мс. Для  $I_Ks$  протокол стимуляции был от  $-30$  мВ до  $+60$  мВ (в группах PP1 и PP3) и от  $-40$  мВ до  $+50$  мВ (в группе PP2) с шагом в  $15$  мВ.

После отмыва кардиоплегического раствора в лабораторных условиях наблюдается уменьшение амплитуды  $I_{Na_v}$  на  $\sim 14\%$  и смещение кривой активации на  $10$  мВ вправо (рис. 1, 2), часть быстрых натриевых каналов в инактивированном состоянии. Такое остаточное подавление быстрых натриевых каналов сохраняется в течение

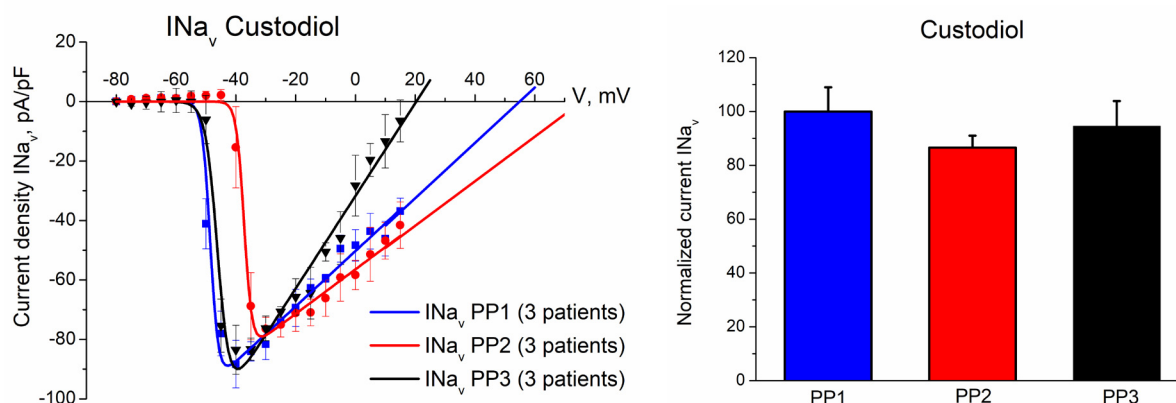


Рис. 1. Вольтамперная кривая быстрых натриевых каналов зрелых человеческих кардиомиоцитов, выделенных из биоптата: до введения Кустодиол (синяя кривая), после введения Кустодиол и отмыва в лаборатории (красная кривая), после отмыва Кустодиол в операционной (черная кривая); нормированные амплитуды  $I_{Na_v}$  в трёх группах

по меньшей мере 7 часов. После восстановления сердечного ритма пациента электрофизиологические свойства быстрых натриевых каналов не сильно меняются относительно группы PP1: амплитуда  $I_{Nav}$  меньше на ~ 6 %, смещение кривой активации 3 мВ вправо (см. рис. 1, 2), что нельзя сказать о медленных калиевых каналах. В случае IKs сильных смещений кривых во всех группах не наблюдается, однако амплитуда IKs после отмыва Кустодиола в лабораторных условиях уменьшается на ~ 70 %, после отмыва в операционной — на ~ 30 % (рис. 3). Таким образом, полученные результаты необходимо принимать во внимание в ходе послеоперационной терапии.

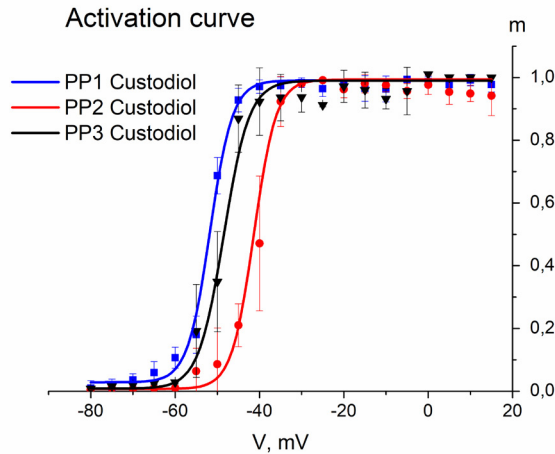


Рис. 2. Кривые активации быстрых натриевых каналов зрелых человеческих кардиомиоцитов, выделенных из биоптата, в трёх группах

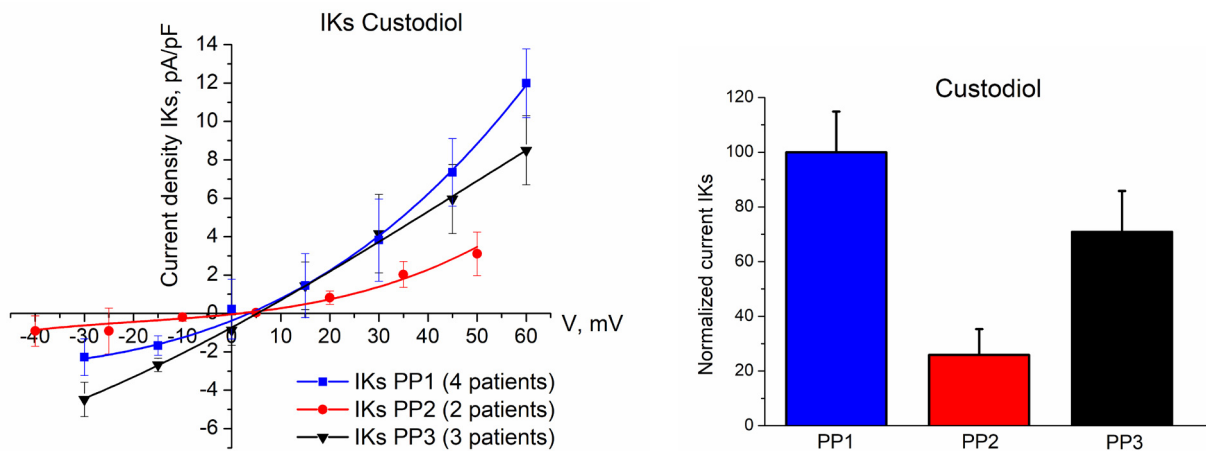


Рис. 3. Вольтамперная кривая медленных калиевых каналов зрелых человеческих кардиомиоцитов, выделенных из биоптата; нормированные амплитуды  $I_{Nav}$  в трёх группах

### Литература

1. Carmo H.P., Reichert K., Carvalho D.D. et al. Lidocaine and pinacidil added to blood versus crystalloid cardioplegic solutions: study in isolated hearts // Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery. 2018. Vol. 33(3). DOI: 10.21470/1678-9741-2017-0244.
2. Ferguson Z.G., Yarborough D.E., Jarvis B.L., Sistino J.J. Evidence-based medicine and myocardial protection — where is the evidence? // Perfusion 2015. Jul. Vol. 30(5). P. 415–422. DOI: 10.1177/0267659114551856.
3. RU 2749986

## МИКРОБИОТОМ КИШЕЧНИКА КРЫС С МЕДИКАМЕНТОЗНО ИЗМЕНЕННЫМ ТИРЕОИДНЫМ СТАТУСОМ НА ФОНЕ ИЗБЫТОЧНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ ФРУКТОЗЫ

В. Д. Кондратенко

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

✉ kondratenkoVD@yandex.ru

### Аннотация

Метаболический потенциал тесного взаимодействия, сложившегося в процессе эволюции, между организмом-носителем и его микробиотомом еще предстоит осознать. Исследование, проведенное на крысах с индуцированным гипо- и гипертиреозом на фоне избытка фруктозы показало отличный состав микробиоты кишечника. Обнаруженные при этом различия в уровнях свободной фракции трийодтиронина косвенно могут быть следствием участия биоценоза в метаболизме йодотиронинов.

### Введение

Микробиотом кишечника представляет собой сложную, метаболически активную экосистему. Все больше доказательств указывает на то, что кишечная микробиота, помимо пищеварительного равновесия также имеет решающее значение для иммунологического, гормонального и метаболического гомеостаза. Взаимовлияние состава микробиотома кишечника и здоровья щитовидной железы, показанное многочисленными исследованиями, обусловлено механизмами усвоения незаменимых микроэлементов, взаимодействием с иммунной системой, участием микроорганизмов в ферментативных процессах и т. д. А интенсивно развивающаяся область исследований фармакомикробиомика изучает, каким образом микробиотом участвует в биотрансформации ксенобиотиков [1].

### Материалы и методы

Проведено исследование на 92 крысах Wistar обоего пола 3–4-месячного возраста массой  $250 \pm 35$  г. Случайным образом животных разделили на три группы: опытные группы с гипо- и гипертиреозом ( $n = 32$ ), и крысы с условным нормотиреозом ( $n = 28$ ). Модели гипер- и гипотиреоза воспроизводили путем введения *L*-тироксина в дозе  $100 \pm 10$  мкг на 100 г массы тела животного 1 раз в сутки и пропилтиоурацила  $2,0 \pm 0,15$  мг на 100 г массы животного 1 раз в сутки внутривентрикулярно через зонд в 1,0 мл пищевого геля. Животные группы нормотиреоза получали по 1,0 мл геля внутривентрикулярно через зонд. Каждая группа была разделена на подгруппы, в которых в качестве питьевой воды крысы получали 15 %-й и 30 %-й раствор фруктозы на протяжении всего исследования. В третьей подгруппе сравнения животные получали питьевую воду. Через 30 суток от начала эксперимента животных выводили передозировкой паров эфира. Смешанную артерио-венозную кровь забирали пункцией из сердца для определения уровня свободной фракции трийодтиронина. Образцы кала забирали в стерильных условиях. Количественную оценку микробиоценоза толстого кишечника проводили методом полимеразной цепной реакции с флюоресцентной детекцией в реальном времени, «Колонофлор».

### Результаты

У крыс, получавших пропилтиоурацил, уровень свободной фракции трийодтиронина снижался только при замене воды на 30 %-ю фруктозу ( $p < 0,05$ , критерий Тьюки). Наиболее информативно менялись уровни: *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Escherichia coli*. Уровень *Lactobacillus spp.* при гипотиреозе в четыре раза превышал уровень при гипертиреозе ( $p < 0,05$ ). Статистически значимые различия в значениях данного показателя обнаружены при замене воды в поилке на 15 %-ю и на 30 %-ю фруктозу. У крыс, получавших пропилтиоурацил (особенно при выпаивании 15 %-й фруктозы), также отмечали повышенное содержание *Escherichia coli* и *Bacteroides spp.* по сравнению с гипертиреозными животными ( $p < 0,05$ ). У крыс, получавших *L*-тироксин, статистически значимо увеличивался уровень *Faecalibacterium prausnitzii* и наиболее значительно при замене воды в поилке на 30 %-ю фруктозу.

### Обсуждение

Показанные в нашем исследовании различия в составе микробиоты кишечника экспериментальных крыс согласуются с данными, опубликованными в литературных источниках [1]. По результатам некоторых наблюдений *Bacteroides* и *Faecalibacterium* могут служить биомаркерами при неинвазивном монито-

ринге функционирования щитовидной железы. Другие исследования обнаружили, что микробиота пациентов с гипертиреозом отличается снижением популяций *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* с увеличением доли *Enterococcus* [2]. Обнаруженные изменения свободного трийодтиронина в сыворотке крови могут служить косвенным доказательством влияния состава микробиоты кишечника на метаболизм гормонов в энтерогапатическом цикле.

#### **Литература**

1. Virili C., Centanni M. «With a little help from my friends» — The role of microbiota in thyroid hormone metabolism and enterohepatic recycling // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017. Vol. 458. P. 39–43.
2. Bargiel P., Maciejewska-Markiewicz D. et al. Microbiome Metabolites and Thyroid Dysfunction // *J. Clin. Med.* 2021. Vol. 10(16). P. 3609.

## РАЗРАБОТКА РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ТРИТИОЦИАНУРОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Е. А. Кополева<sup>1,2</sup>, А. Пельтек<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет  
информационных технологий, механики и оптики

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет

✉ lenkopoleva@yandex.ru

### Аннотация

Работа посвящена разработке метода синтеза наночастиц на основе тритиоциануровой кислоты в качестве носителей низкомолекулярных противоопухолевых препаратов. Представленная работа описывает метод синтеза частиц на основе тритиоциануровой кислоты, их структурную и морфологическую характеристику, а также исследует их адсорбционную способность на примере модельного противоопухолевого препарата — доксорубицина.

Синтез редокс-чувствительных наночастиц является перспективным направлением в развитии систем доставки биологически активных молекул [1]. Их особенность применения заключается в особом механизме высвобождения терапевтических агентов — в возможности внутриклеточной деградации материала частиц за счёт естественных окислительно-восстановительных процессов [2]. Это является перспективной стратегией для достижения стимул-чувствительного и контролируемого высвобождения лекарственных средств [3]. Одним из материалов для редокс-чувствительных частиц могут выступать соединения, содержащие дисульфидные связи, полученные путем мягкого окисления тиоловых групп [4, 5]. В настоящей работе в качестве мономера реакции поликонденсации выбрана тритиоциануровая кислота. Этот материал ранее не применялся для подобных исследований, в чем заключается новизна данного проекта в контексте развития нанотехнологий для биомедицинского применения. Таким образом, целью исследования является разработка системы доставки катионных молекул на примере доксорубицина с использованием редокс-чувствительных наночастиц, полученных на основе поликонденсированной тритиоциануровой кислоты (ТТЦК).

Были разработаны протоколы получения наночастиц ТТЦК с различными параметрами: распределением по размерам, с различным соотношением свободных SH-групп к окисленным дисульфидным связям, а также наночастиц с модификацией полиэтиленгликолем и дитиотриенолом. В зависимости от комбинации этих параметров возможно получение частиц размерами от 100 нм до микронного размера. Дальнейшие исследования проводились на наночастицах с размером 150–200 нм. Также была изучена морфология синтезированных материалов. Изучены адсорбирующие свойства наночастиц ТТЦК на примере модельного соединения — доксорубицина. Помимо этого, была изучена биосовместимость полученных материалов: проведены исследования цитотоксичности, клеточного захвата и деградации *in vitro* на клеточных линиях V16 и HeLa. Также проверено влияние наночастиц ТТЦК, содержащих доксорубицин, на жизнеспособность клеток.

Исходя из полученных результатов следует, что тритиоциануровая кислота — это перспективное соединение для дальнейшего применения в области доставки малых терапевтических молекул. Исследования показали, что полученный материал на основе поликонденсированной ТТЦК является нетоксичным, биосовместимым, биodeградируемым полимером с хорошей адсорбционной емкостью. Дальнейшие исследования заключаются в оптимизации протоколов для увеличения количества получаемого материала и его морфологических характеристик, а также приложения частиц для нужд доставки нуклеиновых кислот.

### Литература

1. Qiao Y., Wan J., Zhou L. et al. Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2019. Vol. 11. № 1.
2. Zyuzin M.V., Antuganov D., Tarakanichikova Y.V. et al. Radiolabeling Strategies of Micron- and Submicron-Sized Core-Shell Carriers for *In Vivo* Studies // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020. Vol. 12. № 28. P. 31137–31147.
3. Li D., Zhang R., Liu G. et al. Redox-Responsive Self-Assembled Nanoparticles for Cancer Therapy // *Advanced Healthcare Materials*. 2020. Vol. 9. № 20. P. 2000605.
4. Ayarza J., Wang Z., Wang J., Esser-Kahn A. P. Mechanically Promoted Synthesis of Polymer Organogels via Disulfide Bond Cross-Linking // *ACS Macro Letters*. 2021. Vol. 10. № 7. P. 799–804.
5. Schäfer O., Barz M. Of Thiols and Disulfides: Methods for Chemoselective Formation of Asymmetric Disulfides in Synthetic Peptides and Polymers // *Chemistry — A European Journal*. 2018. Vol. 24. Of Thiols and Disulfides. № 47. P. 12131–12142.



## ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ КИСЛОРОДА И ГЛЮКОЗЫ НА ОСНОВЕ МОДЕЛИ АРТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА КРЫСЫ

В. С. Копылова, С. Е. Бороновский, Я. Р. Нарциссов

*НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва*

✉ kopilova.veronika@yandex.ru

### Аннотация

Дефицит кислорода и глюкозы в церебральных тканях может вызвать серьезное ухудшение функциональности мозга. Определение концентрации метаболитов в тканях мозга, обеспечивающихся сложной чрезвычайно ветвящейся церебральной сосудистой сетью, является важной задачей. В данной работе предложен подход, позволяющий оценить распределение метаболитов в ткани, учитывая при этом структуру и топологию артериального дерева в целом.

Транспорт питательных веществ и кислорода кровотоком имеет фундаментальное значение для нормального функционирования организма, а также для доставки и удаления лекарств и диагностических агентов в тканях. Изучение диффузии и конвекции веществ в сложной сети кровеносных сосудов являются важными вопросами в фармакокинетике, токсикокинетике и исследованиях в области медицинской визуализации. Основной задачей в данных работах является оценка неоднородности распределения потока и кинетики времени прохождения метаболитов [1]. Артериальная система представляет собой сложную ветвящуюся структуру, содержащую огромное количество сосудов различного калибра. При этом было показано, что топология кровеносной системы оказывает существенное влияние на однородность потока и оксигенацию тканей сосудистой сетью [2].

В данной работе оценка распределения метаболитов в ткани проводилась с использованием модели артериальной системы мозга крысы. В основе модели лежит разделение сосудов на две группы в зависимости от их структурных свойств [3]. При этом к первой группе относятся более крупные артерии, формирующие Виллизиев круг и обладающие характерным пространственным расположением, определяющим эффективность обеспечения мозга кровотоком в целом. Вторая группа представляет собой более мелкие сосуды, которые образуют обширную многократно ветвящуюся сеть и отвечают за доставку крови к окружающим тканям. Данные сосуды реализуются в виде бинарного дерева, построение которого происходит в соответствии с фундаментальными принципами и законами ветвления [4].

Для оценки перфузии тканей мозга в целом проводилась сегментация на локальные области ткани путём построения триангуляции Делоне на множестве узлов дерева. Данный подход обеспечивает корректный и однозначный способ присвоения каждому многограннику области мозга, локализованному около ближайших сосудов. Построенная модель артериальной системы мозга крысы с оптимальными значениями ключевых параметров применялась для оценки интегрального распределения концентрации кислорода и глюкозы во всём мозге. Полученные средние значения для указанных веществ соответствуют экспериментальным данным. С учетом относительно низкой вычислительной сложности как процесса сегментации, так и оценки концентрации в единичном сегменте предложенный в данной работе механизм разбиения объёма мозга на локальные области представляет практический интерес.

### Литература

1. Macheras P., Iliadis A. Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Homogeneous and Heterogeneous Approaches // Springer International Publishing. 2016.
2. Sutalo I.D. et al. Transport by pulsatile flow in a branching network of cerebral vasculature // WIT Transactions on Biomedicine and Health. 2013. V. 17.
3. Kopylova V.S., Boronovskiy S.E., Nartsissov Y.R. Multiparametric topological analysis of reconstructed rat brain arterial system // Physical Biology. 2019. V. 16(5). P. 056002.
4. Kopylova V.S., Boronovskiy S.E., Nartsissov Y.R. Fundamental principles of vascular network topology // Biochemical Society Transactions. 2017. V. 45(3). P. 839–844.

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КАРОТИНОИД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ASTA<sub>P</sub> ПО ДАННЫМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ\*

Ф. Д. Корнилов<sup>1,2</sup>, А. Г. Савицкая<sup>1</sup>, С. А. Гончарук<sup>1,2</sup>, К. С. Минеев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ kornilov.fd@gmail.com

### Аннотация

Каротиноиды — мощные антиоксиданты, которые рассматриваются в качестве потенциальных лекарственных средств против дистрофии сетчатки глаза и нейродегенеративных заболеваний. Агентами их доставки могут потенциально стать найденные в природе каротиноид-транспортирующие белки, например, такие как белок Asta<sub>P</sub>. Для дальнейшей рациональной модификации Asta<sub>P</sub> необходима информация о его пространственной структуре, которая была определена в этой работе.

Asta<sub>P</sub> — каротиноид-транспортирующий белок, выделенный из одноклеточных зеленых водорослей рода *Scenedesmus*. Механизм функционирования данного белка неизвестен, а единственными гомологами с известной пространственной структурой являются фасцилин-подобные белки клеточной адгезии. Asta<sub>P</sub> может рассматриваться в качестве каркаса для создания потенциального агента доставки молекул каротиноидов, сильных антиоксидантов, которые могут использоваться в лекарственных средствах против дистрофии сетчатки глаза и нейродегенеративных заболеваний. Информация о пространственной структуре белка необходима как для фундаментального понимания механизмов работы белка, так и для его рациональной модификации с целью получения направленных агентов доставки антиоксидантов.

В данной работе был разработан протокол продукции изотопно-меченных образцов Asta<sub>P</sub>, были подобраны оптимальные условия для проведения ЯМР-экспериментов и получения комплекса *in vitro* Asta<sub>P</sub> с молекулой астаксантина, каротиноида, с которым Asta<sub>P</sub> преимущественно связывается *in vivo*. Была определена пространственная структура Asta<sub>P</sub> в комплексе с молекулой астаксантина методами ЯМР-спектроскопии в растворе. Было установлено, что Asta<sub>P</sub> может связывать молекулу астаксантина двумя равнозначными способами. По данным ЯМР-релаксации была охарактеризована подвижность основной цепи Asta<sub>P</sub>, находящегося в комплексе с молекулой астаксантина. Для свободной формы Asta<sub>P</sub> удалось фрагментарно определить вторичную структуру.

\* Работа поддержана грантом Президента РФ № МД 2834.2022.1.4.  
© Ф. Д. Корнилов, А. Г. Савицкая, С. А. Гончарук, К. С. Минеев, 2022

**ОЦЕНКА ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ОСНОВЕ ТЕОРИИ НЕЧЕТКИХ МНОЖЕСТВ**А. В. Косенко<sup>1</sup>, А. О. Цибулина<sup>1</sup>, В. П. Демкин<sup>1</sup>, В. В. Удут<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Томский государственный университет<sup>2</sup>НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга, Томск

✉ akvff@yandex.ru

**Аннотация**

Проведено исследование свертывающей системы добровольцев в различных клинических ситуациях. Анализ состояния системы свертывания крови пациентов проводился на основе метода низкочастотной пьезотромбоэластографии. Выявлены пограничные случаи, при которых возможна неверная трактовка диагноза состояния гемостатического потенциала. Для решения этой проблемы применен метод нечеткой логики в обработке начальных данных, определяющих гемостатический потенциал.

Изучение механизмов свертывания крови и адекватная диагностика патологических состояний системы гемостаза важны для профилактики и своевременного применения терапии при различного рода заболеваниях. Известно, что тромбогеморрагические последствия этих заболеваний являются наиболее опасными для жизни, поскольку являются ведущей причиной смертности во всем мире.

Среди существующих методов исследования системы свертывания крови на первый план вышли так называемые «глобальные» методы, позволяющие осуществлять интегративную оценку гемостатического потенциала. «Глобальные» методы имеют следующие преимущества перед другими методами. Во-первых, анализ крови проводится сразу после ее забора, а во-вторых, при использовании этих методов регистрация всего процесса свертывания крови происходит в режиме реального времени. В связи с этим в данной работе исследование характеристик крови проводилось с использованием теста низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ), позволяющего работать с нативной кровью [1].

В основе теста НПТЭГ лежит резонансно-акустический метод, позволяющий определять вязкоупругие свойства крови в условиях периодических сдвиговых деформаций, получаемых с помощью ультразвуковых преобразователей [2]. Результатом измерения динамики агрегатного состояния крови является кривая интегративного состояния полного цикла гемокоагуляции — зависимость амплитуды электрического сигнала пьезоэлектрического датчика от времени  $A_i(t)$  [3].

Реологические свойства крови зависят от ряда факторов: концентрации форменных элементов крови и их агрегационных показателей, молекулярного состава плазмы, скорости упругих деформаций сдвига. В связи с этим исследовалась динамика вязкоупругих свойств крови для трех клинических ситуаций гемокоагуляции (гипер-, гипо- и норма) при различных частотах колебаний иглы-резонатора пьезоэлектрического датчика.

Поскольку процесс свертывания крови является индивидуальной характеристикой и зависит от состояния гемостаза человека, то при проведении исследования гемостатического потенциала у пациентов с различной клинической ситуацией и здоровых добровольцев было выявлено различие в поведении кривой изменения агрегатного состояния крови, а именно: значительный разброс данных внутри одной группы коагулограмм и перекрытие областей, принадлежащих различным группам. В таких случаях для адекватной оценки состояния гемостатического потенциала мы применили метод нечеткой логики как наиболее эффективный метод обработки данных.

Применение метода нечеткой логики предполагает проведение отбора наиболее статистически значимых параметров, влияющих на свертываемость крови. При нечетком моделировании в качестве входных параметров определен следующий набор: концентрация фибриногена; концентрация протромбина; время начала генерации тромбина; время достижения максимальной активности тромбина; протромбиновая активность; эффективное время наработки тромбина. Выходной переменной является лингвистическая переменная «Гемостатический потенциал», для определения которой была сформирована база логических правил. Расчеты проводились при использовании программного пакета MATLAB 2015b, модуль FUZZY LOGIC TOOLBOX.

В результате проведенных исследований показано, что выбранный набор начальных данных позволяет значительно повысить достоверность оценки состояния гемостатического потенциала по сравнению с обычной процедурой анализа данных теста НПТЭГ.

**Литература**

1. Тютрин И.И., Удут В.В. Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. Томск: Изд. дом Том. гос. ун-та, 2016. 170 с.
2. Демкин В.П., Мельничук С.В., Удут В.В. и др. Физические принципы метода низкочастотной пьезотромбоэластографии для изучения реологических свойств цельной крови // Изв. вузов. Физика. 2019. Т. 62. № 6. С. 47–56.
3. Удут В.В., Тютрин И.И., Котловская Л.Ю. и др. Технология низкочастотной пьезотромбоэластографии в оценке гемостатического потенциала // Вестн. новых мед. технологий: электронный журн. 2016. № 4. С. 104–113.

## ИЗМЕНЕНИЯ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЖЕЛУДОЧКОВ СЕРДЦА ПЕРЕД ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ БЛОКИРОВКОЙ ДЕПО-ЗАВИСИМОГО КАЛЬЦИЕВОГО ТОКА\*

Е. Е. Котихина<sup>1</sup>, Г. В. Осипов<sup>1</sup>, И. В. Мухина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

✉ elharkov@gmail.com

### Аннотация

Представленная работа посвящена исследованию методом мультиэлектродного картирования гибкими матрицами различий в изменении биоэлектрической проводимости миокарда правого и левого желудочков сердца крысы перед развитием фибрилляции, вызванной блокировкой депо-зависимого кальциевого тока.

Фибрилляция желудочков является наиболее частой причиной внезапной сердечной смерти. Механизмы развития и возможности предотвращения данного состояния являются важным предметом исследования. Причиной возникновения фибрилляции может стать химически-обусловленное нарушение мембранных ионных токов, в результате которого возникают замедление и рассинхронизация проведения волны возбуждения в миокарде. Данные изменения, в свою очередь, вызывают разобщение сокращений кардиомиоцитов и, тем самым, нарушение сократительной активности сердца, необходимой для полноценного перекачивания крови. Например, блокировка депо-зависимых кальциевых токов может вызвать фибрилляцию сердца, вероятно, за счет нарушения внутриклеточной кальциевой динамики. Результаты ранее проведенных нами исследований показали значительное увеличение (в 2–7 раз) значения латентности электрических сигналов (ЛЭС) в левом желудочке перед началом фибрилляции, вызванной данным способом. Целью представленного исследования было установить различия в изменении значений ЛЭС при развитии фибрилляции в правом и левом желудочках изолированного сердца крысы.

Эксперименты были проведены на изолированных сердцах крыс, перфузируемых по методу Лангендорфа. Аутбредных крыс сток Wistar массой 180–230 г наркотизировали (Золетил 100, Virbac Sante Animale, 35 мг/кг, в/б), затем изолированные сердца подвергались ретроградной перфузии раствором Кребса—Хензелейта (37 °С, 80 мм водного столба, рН 7,3–7,4), насыщенным карбогеном (95 % O<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub>). Фибрилляция желудочков провоцировалась добавлением блокатора депо-зависимого кальциевого тока 2-аминоэтоксидифенил бората в перфузионный раствор (С = 10 мкМоль).

Регистрация электрической активности сердца осуществлялась одновременно с помощью гибких мультиэлектродных матриц MEAFlex72 и EcoFlexMEA36 (Multichannel systems, Германия) с поверхностями левого и правого желудочков соответственно. В качестве показателей электрической активности оценивалась ЛЭС — временная задержка между моментами активации на двух выбранных электродах. За моменты активации принимались точки значения максимума крутизны нарастания локальных полевых потенциалов. Методом мультиэлектродного картирования нельзя изучить характеристики распространения возбуждения в трансмуральном направлении. Но в случае достаточно высокого пространственного разрешения между электродами матрицы (порядка 500 мкМ) становится возможным исследовать параметры распространения фронта биоэлектрической волны в пределах области его прорыва на поверхности миокарда. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием критерия Фридмана для повторных измерений ( $p < 0,05$ ). Значения ЛЭС измерялось в нормальных условиях перфузии сердец, за три и за одну минуту до начала фибрилляции желудочков.

В результате проведенного исследования было показано отсутствие статистически значимых различий между значениями ЛЭС в левом и правом желудочках как в нормальных условиях, так и при увеличении ЛЭС, предшествующему началу фибрилляции. При этом в правом желудочке было установлено более выраженное нарушение однородности проведения возбуждения, которое проявлялось в увеличении дисперсии реполяризации и изменении формы локальных полевых потенциалов.

Полученные результаты свидетельствуют об однородности механизма нарушений биоэлектрической активности обоих желудочков в ходе блокировки депо-зависимого кальциевого тока. При этом гистологические особенности правого желудочка обуславливают повышенную подверженность миокарда нарушениям, вызванным данным способом.

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, проект № 0729-2021-013.

## ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С НА КАЛЬЦИЕВУЮ РЕГУЛЯЦИЮ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РАЗНЫХ КАМЕРАХ СЕРДЦА\*

А. М. Кочурова<sup>1</sup>, Е. А. Бельдия<sup>1,2</sup>, Д. С. Ямпольская<sup>3</sup>, А. М. Матюшенко<sup>3</sup>, Г. В. Копылова<sup>1</sup>, Д. В. Щепкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

✉ zgupkabeldya@gmail.com

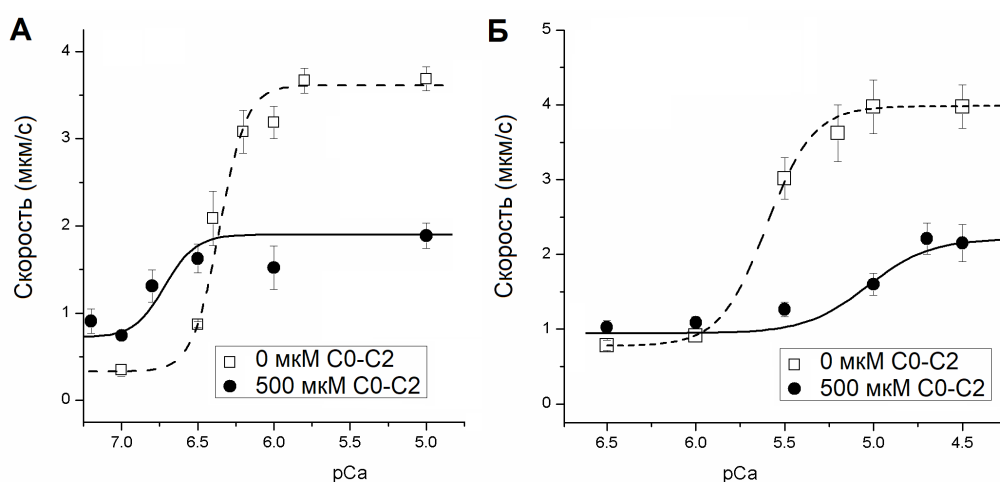
### Аннотация

Сердечный миозинсвязывающий белок-С (сМуВР-С) является одним из регуляторов сокращения миокарда. N-концевой участок молекулы сМуВР-С содержит сайты взаимодействия с белками тонкой и толстой нитей саркомера. Используя изолированные белки в *in vitro* подвижной системе обнаружено, что С0-С2-фрагмент сМуВР-С увеличивает  $Ca^{2+}$ -чувствительность актин-миозинового взаимодействия в желудочках, но уменьшает её в предсердиях.

Сокращение миокарда происходит благодаря взаимодействию миозина с актином и регулируется  $Ca^{2+}$ . Сердечный миозинсвязывающий белок-С (сМуВР-С) участвует в активации сокращения миокарда [1]. Молекула сМуВР-С массой 140–150 кДа состоит из восьми иммуноглобулиновых и трех фиброниктиновых доменов, обозначаемых от С0 на N-конце до С10 на С-конце [1]. Домены С0-С2 содержат сайты связывания миозина, в том числе регуляторной лёгкой цепи миозина, актина и тропомиозина (Трп) [1]. Миозин предсердий и желудочков отличается изоформным составом тяжелых и лёгких цепей миозина. С помощью *in vitro* подвижной системы (ИПС) мы сравнили влияние N-концевых доменов сМуВР-С на  $Ca^{2+}$ -регуляцию взаимодействия с актином миозина предсердий и желудочков.

Предсердный и желудочковый миозин и тропонин выделяли из миокарда свиньи, актин — из *m. psoas* кролика. Фрагменты С0, С0-С1 и С0-С2 сМуВР-С и  $\alpha$ -Трп человека экспрессировали в *E. coli*. Анализировали  $Ca^{2+}$ -зависимость скорости скольжения тонких нитей, реконструированных из актина, тропонина и тропомиозина, по миозину в ИПС [2]. Зависимость аппроксимировали уравнением Хилла и определяли максимальную скорость при насыщающей концентрации  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -чувствительность — значение  $pCa$ , при котором достигается полумаксимальная скорость нитей, и коэффициент кооперативности Хилла. Сравнения проводили по *U*-критерию Манна — Уитни ( $p < 0,05$ ).

Обнаружено, что N-концевые фрагменты сМуВР-С оказывают разный эффект на характеристики  $Ca^{2+}$ -зависимости скорости скольжения тонких нитей по миозину предсердий и желудочков в ИПС (см. рисунок). С0-С2-фрагмент сМуВР-С примерно в два раза уменьшал максимальную скорость тонких нитей и коэффициент кооперативности Хилла и значительно увеличивал  $Ca^{2+}$ -чувствительность скорости нитей по миозину желудочков, что согласуется с ранее полученными данными [3]. С миозином предсердий С0-С2-фрагмент существенно уменьшал и максимальную скорость тонких нитей, и её  $Ca^{2+}$ -чувствительность.



Влияние С0-С2 фрагмента сМуВР-С на кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей, реконструированных из актина, тропонина и тропомиозина, по миозину желудочков (А) и предсердий (Б) в *in vitro* подвижной системе

\* Работа поддержана РНФ (грант №22-14-00174) и выполнена на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН.

Эта разница результатов может объясняться отличием взаимодействия C0-C2-фрагмента сMyBP-C с регуляторной лёгкой цепью миозина предсердий и желудочков. Миозин предсердий и желудочков обладают регуляторными лёгкими цепями предсердного и желудочкового типа соответственно. Особенности взаимодействия разных изоформ сократительных и регуляторных белков в желудочках и предсердиях служат осуществлению специфической сократительной функции разных камер сердца.

#### **Литература**

1. Heling L.W.H.J., Geeves M.A., Kad N.M. MyBP-C: one protein to govern them all // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2020. V. 41(1). P. 91–101.
2. Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Nikitina L.V., Katsnelson L.B., Bershitsky B. Y. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an in vitro motility assay // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. V. 401. P. 159–163.
3. Mun J.Y., Previs M.J., Yu H.Y., et al. Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. V. 111(6). P. 2170–2175.
4. Inchingolo A.V., Previs S.B., Previs M.J, Warshaw D.M., Kad N.M. Revealing the mechanism of how cardiac myosin-binding protein C N-terminal fragments sensitize thin filaments for myosin binding // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. V. 116(14). P. 6828–6835.

## ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ ТРОПОМОДУЛИНА В РЕГУЛЯЦИИ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ \*

А. М. Кочурова<sup>1</sup>, Е. А. Бельдия<sup>1,2</sup>, С. Р. Набиев<sup>1</sup>, Л. В. Никитина<sup>1</sup>,  
А. В. Пивоварова<sup>3</sup>, А. М. Матюшенко<sup>3</sup>, Д. В. Щепкин<sup>1</sup>, Г. В. Копылова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

✉ kochurova.a.m@mail.ru

### Аннотация

Для сократительной функции поперечнополосатых мышц необходима упорядоченность и стабильность структуры саркомера, в обеспечении которых принимает участие тропомодулин (Tmod). Используя изолированные сократительные белки в *in vitro* подвижной системе, обнаружено, что Tmod принимает участие в регуляции актин-миозинового взаимодействия в миокарде.

Тропомодулин (Tmod) является актин-связывающим белком, который, связываясь с медленно растущим минус-концом актиновой нити, предотвращает её разборку, определяет её длину и стабильность [1]. В миокарде экспрессируется изоформа Tmod1, а в скелетных мышцах — Tmod1 и Tmod4. Молекула Tmod содержит два сайта связывания тропомиозина (Trm) и взаимодействует с двумя молекулами Trm [2]. Показано, что Tmod участвует в активации тонкой нити и влияет на силогенерирующую способность мышц [3]. Мы исследовали влияние Tmod на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде.

F-актин и тропонин выделяли из *m. psoas* кролика и левого желудочка быка соответственно. Миозин экстрагировали из левого желудочка овцы. Tmod1, Tmod4 и альфа-Trm человека экспрессировали в *E. coli*. Влияние Tmod на взаимодействие Trm с актином оценивали, измеряя изгибную жёсткость тонкой нити в оптической ловушке [4]. Участие Tmod в актин-миозиновом взаимодействии исследовали, анализируя влияние 500 нМ Tmod на Ca<sup>2+</sup> зависимость скорости скольжения тонких нитей, реконструированных из F-актина, тропонина и Trm, по миозину в *in vitro* подвижной системе [5]. Ca<sup>2+</sup> зависимость скорости аппроксимировалась уравнением Хилла, и определялись максимальная скорость нитей при насыщающей концентрации Ca<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> чувствительность, значение *p*Ca, при котором скорость нитей полумаксимальна, и коэффициент кооперативности Хилла.

Обнаружено, что Tmod4 уменьшал, а Tmod1 не влиял на изгибную жёсткость тонкой нити. Аминокислотная последовательность N-терминальной части Tmod1 и Tmod4 имеет отличия [6], определяющие особенности взаимодействия изоформ Tmod с Trm. Разница влияния изоформ Tmod на изгибную жёсткость тонкой нити говорит о том, что изоформы Tmod специфически взаимодействуют с актином и Trm, что может иметь значение для реализации сократительной функции разных типов поперечнополосатых мышц.

Tmod1 и Tmod4 по-разному влияли на характеристики актин-миозинового взаимодействия. Tmod1 и Tmod4 снижали Ca<sup>2+</sup>-чувствительность скорости тонких нитей на 0,18 и 0,12 единиц *p*Ca соответственно. Tmod4 увеличивал коэффициент Хилла в два раза и максимальную скорость тонких нитей по миозину на 10 %.

Полученные результаты позволяют предположить, что тропомодулин влияет на подвижность Trm тяжа на F-актине, и сделать вывод о том, что Tmod является одним из белков, участвующих в регуляции актин-миозинового взаимодействия.

### Литература

1. Gokhin D.S., Fowler V.M. Tropomodulin capping of actin filaments in striated muscle development and physiology // Journal of biomedicine & biotechnology. 2011. P. 103069.
2. Kostyukova A.S., Choy A., Rapp B.A. Tropomodulin binds two tropomyosins: a novel model for actin filament capping // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 12068–12075.
3. Ochala J., Gokhin D.S., Iwamoto H., Fowler V.M. Pointed-end capping by tropomodulin modulates actomyosin crossbridge formation in skeletal muscle fibers // FASEB Journal. 2014. V. 28. P. 408–415.
4. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V. et al. Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament // Biophysical Journal. 2015. V. 109(2). P. 373–379.
5. Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Kopylova G.V. et al. Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in the troponin T-binding region of cardiac tropomyosin // Biochemistry. 2017. V. 56(1). P. 250–259.
6. Greenfield N.J., Kostyukova A.S., Hitchcock-DeGregori S.E. Structure and tropomyosin binding properties of the N-terminal capping domain of tropomodulin I // Biophysical Journal. 2005. V. 88(1). P. 372–383.

\* Работа поддержана РФФ (грант №22-24-00729) и выполнена на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН.

## ДИМЕРИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ: РОЛЬ ЛИПИДНОГО ОКРУЖЕНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ\*

А. С. Кузнецов<sup>1,2</sup>, Р. Г. Ефремов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ akuznecsov@hse.ru

### Аннотация

Трансмембранные домены рецепторов семейства ErbB взаимодействуют с локальным липидным окружением. С помощью методов молекулярного моделирования выявили закономерности формирования белок-липидных контактов вблизи гликофоринподобных мотивов в таких белках и описали их структурно-динамические особенности.

Рецепторные тирозинкиназы (РТК) — большой класс мембранных белков, отвечающих за передачу сигналов через клеточную мембрану. Особенностью их строения является трансмембранный домен, представленный единственной альфа-спиралью и непосредственно участвующий в формировании функциональных димеров и передаче сигнала. Накопленные экспериментальные данные указывают на наличие у РТК различных конформаций, соответствующих активным и неактивным состояниям, стабилизированных в определённом липидном окружении. Мозаичное устройство клеточной мембраны играет важную роль в управлении сигналингом: различные физико-химические свойства локального мембранного окружения может «переключать» рецепторы между состояниями и делает определённые конформации более выгодными энергетически. Для количественной оценки свободной энергии формирования димеров в зависимости от состава модельной липидной мембраны использовали методы атомистического моделирования. Потенциальные сайты белок-липидных взаимодействий выявляли на основании анализа частоты встречаемости белок-липидных контактов в траекториях молекулярной динамики и соотносили с гидрофобными/гидрофильными свойствами поверхности. Для трансмембранных сегментов рецепторов семейства ErbB, содержащих гликофоринподобный сайт димеризации, наблюдали преимущественное связывание ацильных цепей липидов в области данного сайта, несмотря на несоответствие локальных гидрофобных свойств. При формировании димеров происходило смещение плотности, соответствующей связанным липидам, ближе к поверхности мембраны. Изменение подвижности липидного окружения вблизи мономера и димера рецептора может являться одним из триггеров для передачи сигнала рецептором внутрь клетки, поскольку внутриклеточный домен сильно связан с поверхностью мембраны в базальном неактивном состоянии. Результаты моделирования позволили непосредственно продемонстрировать участие липидов мембраны в стабилизации определённых димерных конформаций рецепторов семейства ErbB.

\* Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ и поддержана грантом РФФ №18-14-00375.



## ИЗУЧЕНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ФУМАРАТА И ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА ФИБРОБЛАСТЫ ЧЕЛОВЕКА

П. С. Купцова<sup>1,2</sup>, Л. Н. Комарова<sup>1</sup>, Е. Р. Выпова<sup>1</sup>, А. А. Берсенева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск

<sup>2</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск

✉ kuptsova\_apollinaria@mail.ru

### Аннотация

Проведено исследование комбинированного действия фумарата и гамма-излучения на фибробласты человека. Показан радиозащитный эффект фумарата, который оценен по показателю времени удвоения.

В современной онкологии лучевая терапия является одним из ведущих методов лечения злокачественных новообразований. Однако воздействие ионизирующего излучения на нормальные ткани, окружающие опухоль, может привести к острой и хронической токсичности, а также к лучевым поражениям, вследствие того, что излучение невозможно достаточно локально подвести к очагу поражения. Данные обстоятельства ограничивают проведение намеченного курса терапии из-за широкого спектра побочных эффектов. [1]

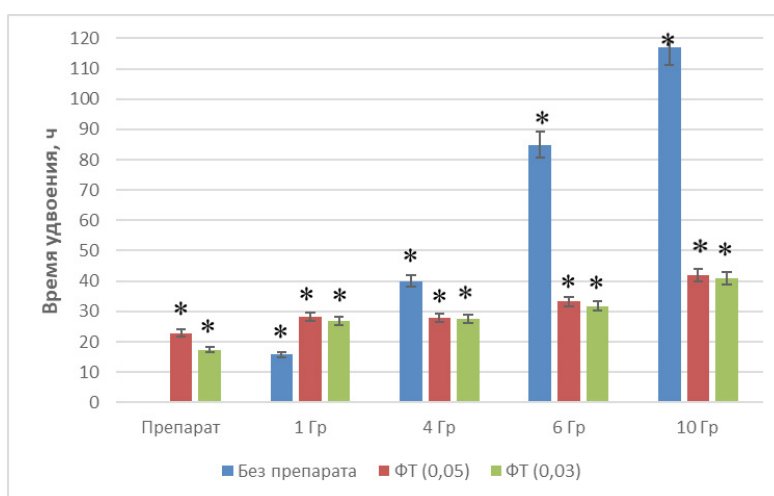
Радиозащитные соединения имеют важное значение в лучевой терапии, поскольку нормальные ткани должны быть защищены от лучевого поражения при использовании высоких доз облучения. [2]

Актуальным является разработка новых способов защиты нормальных тканей во время лучевой терапии злокачественных новообразований с использованием радиопротекторов.

Фумарат является интермедиатом в цикле Кребса, образующийся при окислении сукцината ферментом сукцинатдегидрогеназой, и далее превращающийся в малат ферментом фумаразой.

Объектом исследования была выбрана клеточная культура фибробластов (hTERT) человека. Культивирование проводилось по стандартной методике. Клетки были разделены на группы: в первой группе клетки подвергали действию только ионизирующего облучения (ИИ) — гамма-излучения (источник <sup>60</sup>Co, E = 1,25 МэВ); во второй группе клетки инкубировали 24 часа в растворе фумарата в концентрациях 0,05 мг/мл и 0,03 мг/мл; третья группа клеток подвергалась комбинированному действию гамма-излучения и препарата. Контролем служили интактные клетки. Выживаемость клеток оценивали по показателю времени удвоения.

На рисунке представлены результаты измерения времени удвоения клеток после 48 часов инкубации фибробластов с фумаратом без облучения, облучения гамма-квантами без препарата и комбинированного действия фумарата и облучения в разных дозах.



Время удвоения фибробластов после действия фумарата, облучения и комбинированного действия фумарата и облучения в разных дозах (\* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$ )

Видно, что фумарат оказывает радиозащитное действие: время удвоения клеток при комбинированном действии гамма-излучения и фумарата в обеих исследуемых концентрациях значительно меньше, чем при действии только гамма-излучения в тех же дозах. При комбинированном действии фумарата и облучения время удвоения остается примерно на одном уровне при дозах облучения 1, 4, 6 Гр, а при 10 Гр незначительно повышается. При сравнении двух исследуемых концентраций фумарата можно сделать вывод, что фумарат более эффективно действует в концентрации 0,03 мг/мл.

Полученные результаты показывают перспективность применения фумарата в качестве радиопротектора.

#### **Литература**

1. Galeas Ch., Totis C., Bisio A. Radiation resistance: a matter of transcription factors // *Frontiers in Oncology*. 2021. V. 11. P. 1–23.
2. Nair C.K., Salvi V., Kagiya T.V., Rajagopalan R. Relevance of radioprotectors in radiotherapy: studies with tocopherol monoglucoside // *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 2004. V. 23(2). P. 153–160.

## ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ ПРИ РАЗНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

Т. Г. Курьянчик, Н. В. Козел

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

✉ t.kuryanchyk@gmail.com

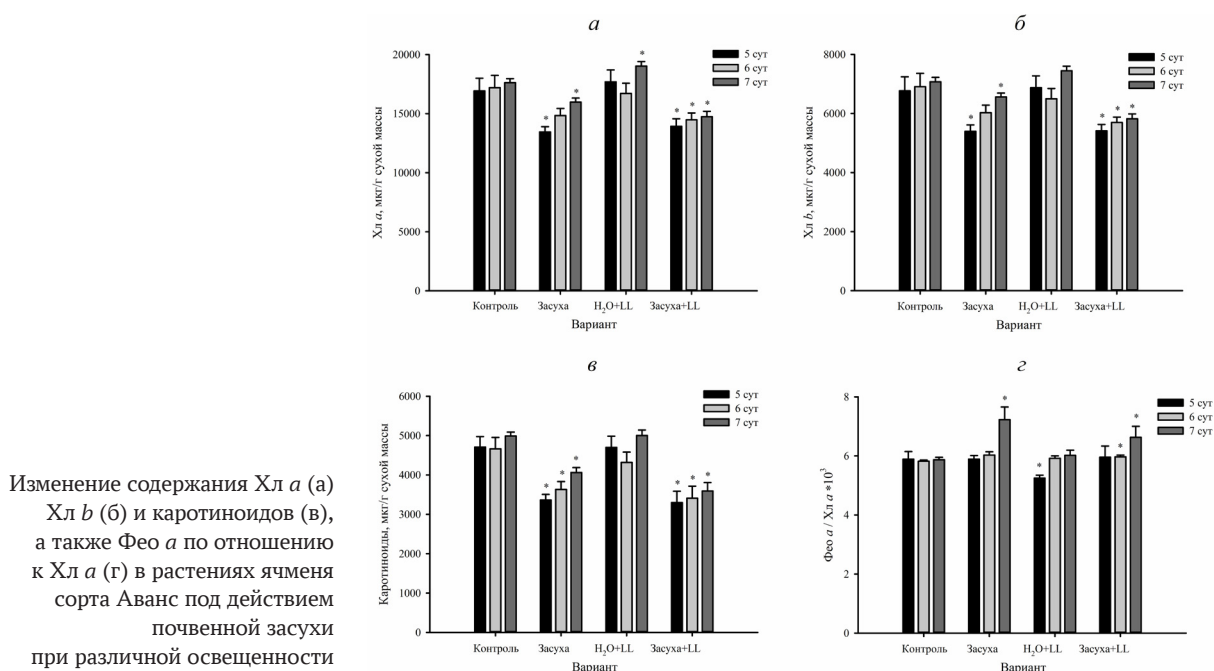
### Аннотация

Изучено влияние почвенной засухи и условий освещенности на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Аванс. Показано, что в вариантах, выращенных в условиях засухи, содержание пигментов было ниже по сравнению с контролем в среднем на 20 %. При этом наблюдалось увеличение содержания Фео *a* по отношению к Хл *a* на 23 % при нормальной и 13 % при низкой освещенности по сравнению с контролем, что указывает на светозависимый механизм индукции окислительного стресса при почвенной засухе.

На сегодняшний день засуха является одним из наиболее серьезных стрессовых факторов для растений, который оказывает значительное влияние на различные физиологические и биохимические процессы и приводит к существенным потерям урожая в сельском хозяйстве [1]. Фотосинтез как самый фундаментальный и сложный физиологический процесс в зеленых растениях очень восприимчив ко многим неблагоприятным факторам окружающей среды, включая засуху [2], в результате чего в растительной клетке происходит нарушение устьичной регуляции, связанной с ограничением подачи  $\text{CO}_2$ , что отрицательно сказывается на функциональной активности фотосистем и уменьшает перенос электронов, приводя к снижению АТФ и НАДФН [3] и избыточному накоплению активных форм кислорода [4]. Целью данной работы являлось изучение влияния почвенной засухи и условий освещенности на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя.

В качестве объекта исследования использовали 5-7-дневные проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Аванс, выращенные в лабораторных условиях в режиме 14 ч света при нормальной интенсивности 6000 лк (варианты Контроль и Засуха) и низкой — 2000 лк (варианты  $\text{H}_2\text{O}+\text{LL}$  и Засуха+LL) и 10 ч темноты под люминесцентными лампами Philips TD-36/765 при температуре  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  и относительной влажности воздуха  $35 \pm 2\%$  в нормальных условиях (ежедневный полив водопроводной водой из расчета 25 мл воды на 300 г почвы) и при засухе (растения не поливали с момента посадки в почву). Состав и содержание хлорофиллов (Хл) *a* и *b*, феофитина (Фео) *a* и каротиноидов в листьях ячменя определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [5].

Установлено, что во всех исследуемых вариантах происходит увеличение содержания пигментов в зависимости от длительности выращивания (см. рисунок, *a-e*). При этом стоит отметить, что в листьях ячменя, вы-



ращенных в условиях засухи, начальный уровень пигментов был значительно ниже и составлял в среднем для Хл *a* — 81 %, Хл *b* — 80 %, каротиноидов — 71 %, а к 7-му дню выращивания данные показатели несколько увеличивались и достигали для Хл *a* — 91 % и 84 %, Хл *b* — 93 % и 82 %, каротиноидов — 81 % и 72 % от контроля для вариантов Засуха и Засуха+LL соответственно, что может быть признаком окислительного стресса в результате фотоокисления и деградации пигментов [2] и/или регуляции их биосинтеза.

Развитие окислительного стресса в листьях растений ячменя при действии почвенной засухи демонстрирует изменение содержания Фео *a* по отношению к Хл *a* на 7-е сутки выращивания (см. рисунок, *з*). Выявлено, что данный показатель увеличился на 23 % и 13 % по сравнению с контролем для вариантов Засуха и Засуха+LL соответственно, что указывает на светозависимый механизм индукции окислительного стресса при почвенной засухе.

#### Литература

1. Chiappero J., Cappellari L.R., Alderete L.G.S. et al. Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content // *Ind. Crops Prod.* 2019. V. 139. Art. 111553.
2. Talbi S., Rojas J.A., Sahrawy M. et al. Effect of drought on growth, photosynthesis and total antioxidant capacity of the Saharan plant *Oudeneya africana* // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 176. Art.104099.
3. Ashraf M., Harris P.J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview // *Photosynthetica.* 2013. Vol. 51, № 2. P. 163–190.
4. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48, No. 12. P. 909–930.
5. Каляга Т.Г., Козел Н.В. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология.* 2020. № 3. С. 46–53.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ЭМАЛЕВО-ДЕНТИННОГО СОЕДИНЕНИЯ ЗУБОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

К. Н. Курятников<sup>1</sup>, В. Д. Вагнер<sup>2</sup>, В. П. Конев<sup>1</sup>, А. С. Коршунов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Омский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва

✉ Andrey\_K\_180588@mail.ru

### Аннотация

Авторами описаны три типа морфологического строения эмаливо-дентинного соединения: крупнофестончатый, мелкофестончатый, микрофестончатый, которые влияют на скорость минерализации и созревания эмалевых призм всего эмалевого слоя.

Эмаливо-дентинное соединение (ЭДС) является уникальным элементом зуба, которое представляет важное значение для фундаментальной и прикладной стоматологии [1]. В литературе мало публикаций о ее предназначении, многие ученые едины во мнении, что ЭДС расположено между эмалью и дентином, осуществляет дренажную и амортизирующую функции [2]. Описанное соединение имеет вид фестонов или зубцов, которые вклиниваются друг в друга, напоминая замок «молния» [3]. Данная структурная особенность в большой степени оказывает влияние на прочностные характеристики тканей зуба [4].

### Цель

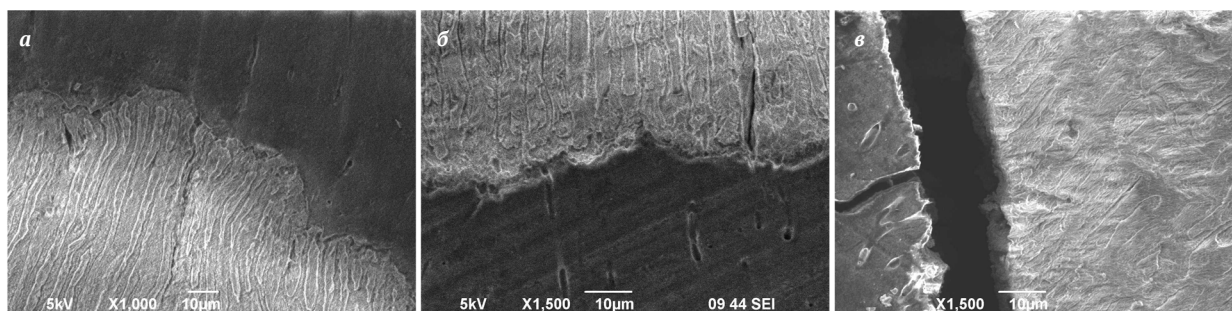
Изучить морфологические типы эмаливо-дентинного соединения зубов человека методом растровой электронной микроскопии.

### Материал и методы

Удаление интактных нижних зубов «мудрости» проводилось по ортодонтическим показаниям у женщин в возрасте 21–30 лет ( $n = 40$ ). Подготовка шлифов образцов зубов 38, 48 для растровой электронной микроскопии осуществлялась по методике, которая моделирует механическое и химическое воздействие на твердые ткани (Патент РФ на изобретение №2702903 от 14.10.19 г.). Исследование ультраструктуры осуществлялось с применением растрового электронного микроскопа Jeol JSM-5700. Анализировались форма, размер, поверхность ЭДС и эмали в поверхностном, среднем и глубоком отделах зубов. Обработка полученных данных проводилась методами вариационной статистики с использованием Statistica 12.0. (StatSoftInc. USA).

### Результаты

Систематизированы и описаны три типа структурной организации эмаливо-дентинного соединения: крупнофестончатый, со степенью взаимовнедрения эмали в дентин  $21,49 \pm 9,52$  мкм (см. рисунок, а), мелкофестончатый —  $6,34 \pm 3,21$  мкм (см. рисунок, б), микрофестончатый —  $1,46 \pm 0,78$  мкм (см. рисунок, в) ( $p = 0,0001$ ). При крупнофестончатом типе эмалевые призмы глубокой и средней зон правильно упорядочены с плотной упаковкой, протяженность беспризмной зоны поверхностного слоя более 20 мкм; при мелкофестончатом типе эмалевые призмы глубокого слоя менее упорядочены, в средней зоне призмы более зрелые, протяженность бес-



Ультраструктура эмаливо-дентинного соединения: а — при крупнофестончатом типе ЭДС, ув. 1000; б — при мелкофестончатом типе ЭДС, ув. 1500; в — при микрофестончатом типе ЭДС, ув. 1500 (растровая электронная микроскопия)

призмной зоны от 10 до 20 мкм; при микрофестончатом типе эмалевые призмы в средней зоне слабо упорядочены с широкими межпризменными пространствами, в глубокой зоне встречаются в единичных количествах, протяженность беспризмной зоны от 2 до 10 мкм. При крупнофестончатом типе ЭДС отмечается высокая степень поверхностного сцепления эмали с дентином, большая прочность и упругость; при мелкофестончатом типе происходит уменьшение площади сцепления, но сохраняются высокие прочностные параметры; при микрофестончатом типе соединение напоминает линию, а возможность противостоять механическому воздействию значительно снижена.

#### **Выводы**

Выделены три типа эмалево-дентинного соединения, которые определяют структурные, функциональные, прочностные свойства всего эмалевого слоя.

#### **Литература**

1. Костиленко Ю.П., Саркисян Е.Г., Аветиков Д.С. и др. Структура эмали и её конфигурационные отношения с дентином жевательных зубов человека // Вестн. проблем биологии и медицины. 2014. № 2. С. 193–197.
2. Mayoral J.R., Arocha M.A., Domínguez S. et al. *In vivo* spectrophotometric evaluation of pure enamel and enamel-dentine complex in relationship with different age groups // J. Dent. 2013. № 41(12). P. 1245–1250.
3. Wang R., Zhao D., Wang Y. Characterization of elemental distribution across human dentin-enamel junction by scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray spectroscopy // Microsc. Res. Tech. 2021. № 84(5). P. 881–890.
4. Guy F., Lazzari V., Gilissen E. et al. To what extent is primate second molar enamel occlusal morphology shaped by the enamel-dentine junction? // PLoS One. 2015. № 10(9). P. e0138802.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛ-В-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Н. В. Литвинов, Л. О. Соколова, Е. А. Калаева, М. А. Наквасина, В. Г. Артюхов

*Воронежский государственный университет*

✉ litvinov.nikolai97@inbox.ru

### Аннотация

Одним из регуляторов организации и физико-химических свойств биологических мембран является холестерин (ХС) [3]. Посредством направленного изменения концентрации ХС можно оценить его роль в поддержании целостности и упорядоченности липидной фазы мембран и проанализировать влияние липидного состава мембраны на функциональные свойства эритроцитов. Модификации содержания ХС в плазматической мембране возможны при использовании метил- $\beta$ -циклодекстрина (МБЦД), являющегося наиболее эффективным акцептором ХС по сравнению с другими типами циклодекстринов [4].

Нами были исследованы спектральные характеристики эритроцитов крови человека, модифицированных МБЦД в концентрациях 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мМ. Эритроциты выделяли по стандартной методике [1]. Затем к 1 мл суспензии эритроцитов добавляли МБЦД в конечной концентрации 0,5–5 мМ. Регистрацию электронных спектров поглощения (ЭСП) исследуемых образцов проводили на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 190 до 900 нм. Оптическую плотность растворов регистрировали на протяжении всего исследуемого диапазона через 1 нм при ширине спектральной щели 1 нм.

На ЭСП суспензии нативных эритроцитов было обнаружено два максимума в УФ-области (281 и 348 нм) и три полосы поглощения в видимой части спектра (419, 543 и 578 нм), что не противоречит результатам, полученным нами ранее [2]. После инкубации эритроцитов с МБЦД в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 мМ в течение 15 минут было обнаружено изменение положения максимумов поглощения как в ультрафиолетовой, так и в видимой области спектра. Так, при концентрации МБЦД 0,5 мМ были зарегистрированы максимумы при 268, 346, 421, 544 и 579 нм; при 1,0 мМ полосы поглощения в УФ- и видимой частях ЭСП приходились на 278, 348, 419, 544 и 579 нм; при 1,5 мМ — на 276, 346, 416, 544 и 578 нм; при 2,0 мМ — на 279, 351, 419, 544 и 578 нм; при 2,5 мМ — на 275, 345, 420, 544, 579 нм; при 3,0 мМ — на 280, 346, 419, 544, 579 нм; при 3,5 мМ — на 283, 349, 419, 544, 578 нм; при 4,0 мМ — на 282, 349, 419, 544, 579 нм; при 4,5 мМ — на 282, 352, 419, 543, 578 нм; при 5,0 мМ — на 281, 348, 419, 544 и 577 нм. Также на ЭСП суспензий эритроцитов, модифицированных МБЦД, были обнаружены новые максимумы поглощения: при концентрации 2,0 мМ — 228 нм, при 3,0 мМ — 227 нм, 3,5 мМ — 228 нм, 4,0 мМ — 229 нм, 4,5 мМ — 228 нм, 5,0 мМ — 227 нм, что может указывать на конформационные изменения в молекулах гемоглобина. Также было зарегистрировано повышение оптической плотности суспензии эритроцитов, инкубированных с МБЦД в концентрациях 2,0 и 2,5 мМ, что может свидетельствовать о частичном гемолизе исследованных клеток.

Таким образом, МБЦД не способствует образованию метгемоглобина в суспензиях эритроцитов донорской крови, но обуславливает изменения конформации молекул мембрансвязанного и внутриэритроцитарного гемоглобина из-за изменения липидного состава мембраны. МБЦД в концентрациях 2,0 и 2,5 мМ индуцирует частичный гемолиз эритроцитарных клеток.

### Литература

1. Артюхов В. Г. Практикум по биофизике / В. Г. Артюхов [и др.]. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. 294 с.
2. Соколова Л. О. и др. Цитоархитектоника и спектральные свойства эритроцитов, модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет®» // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2021. № 1. С. 122–132.
3. Шевченко О. Г. Роль холестерина в структурной организации мембран эритроцитов // Вестн. ин-та биологии Коми науч. центра Урал. отд-ния РАН. 2010. № 6. С. 10–14.
4. Wang R. et al. Lipid rafts control human melanoma cell migration by regulating focal adhesion disassembly // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research. 2013. Vol. 1833. № 12. P. 3195–3205.

## КОМБИНИРОВАННЫЙ ПОДХОД К СПЕКТРАЛЬНОМУ АНАЛИЗУ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЕЙ НА ПРИМЕРЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ \*

Н. М. Малыгина<sup>1,2</sup>, А. Ю. Лянгузов<sup>1</sup>, Т. А. Петрова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

✉ n.malygina@spbu.ru

### Аннотация

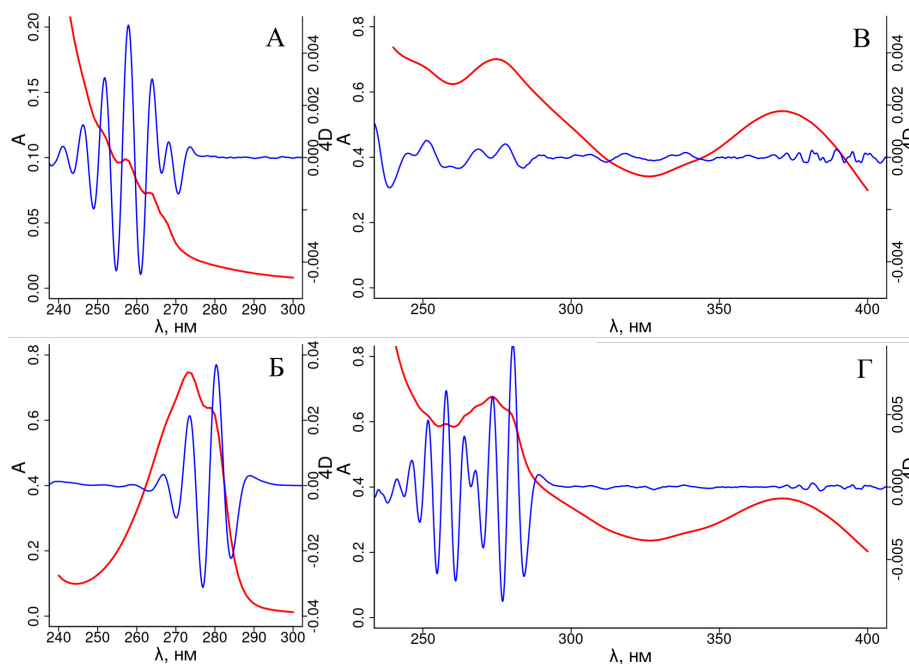
В модельных экспериментах на примере широко используемых в медицине и ветеринарии антибиотиков — бензилпенициллина и тетрациклина, и антисептика резорцина показано, как, комбинируя возможности математической обработки спектров поглощения, качественно и количественно оценивать составы сложных смесей фармакологических препаратов. Предлагаемый подход может оказаться полезным и для иных целей, например, при проведении экологического мониторинга.

Методы спектрального анализа регулярно используются при решении широкого круга проблем, в том числе для идентификации фармакологических препаратов и оценки их качества (*Государственная фармакопея РФ*).

Однако более сложную техническую задачу представляет собой экспресс-анализ многокомпонентных смесей лекарственных веществ, особенно в случаях перекрывания полос поглощения света отдельными хромофорными группами, входящими в составы индивидуальных соединений.

В настоящей работе в модельных экспериментах показано, как сочетание методов производной спектрофотометрии с анализом исходных спектров поглощения позволяет при наличии стандартов не только выявить присутствие отдельных веществ в лекарственных композициях, но и оценить их количество.

Нами изучены спектральные характеристики препаратов бензилпенициллина (см. рисунок, А), резорцина (см. рисунок, Б), тетрациклина (см. рисунок, В) и их смесей в разных количественных соотношениях (см. рисунок, Г). В качестве растворителя использован 0,1 М фосфатный буфер pH 7.4. Исследования проведены на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 в диапазоне длин волн 240–400 нм. Записанные в формате ASCII исходные данные затем были проанализированы с помощью функций и скриптов свободного языка программирования R, а также скриптов авторской разработки.



Спектры поглощения бензилпенициллина (А), резорцина (Б), тетрациклина (В), их смеси (Г) и четвертые производные спектров: — спектры, — четвертые производные спектров

\* Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка СПбГУ.



Несмотря на то что методы производной спектрофотометрии были разработаны уже достаточно давно, практическое их применение, особенно использование четвертых производных спектров, упоминается крайне редко. В то же время именно четвертая производная четко выявляет положение полос поглощения отдельных хромофорных групп, причем их максимумы совпадают с максимумами полос поглощения самих спектров. Метод позволяет визуально или, при наличии стандарта, расчетным путем количественно определить содержание вещества в растворе.

Наши опыты показали, что, даже несмотря на частичное перекрытие полос поглощения бензилпенициллина и резорцина (см. рисунок, А, Б), в смесях с разными их соотношениями наблюдается линейная зависимость между амплитудами четвертых производных неперекрывающихся полос и концентрациями реагентов: коэффициент корреляции составил 0,999.

В спектре еще одного антибиотика — тетрациклина (см. рисунок, В) есть пик поглощения в зоне 370–371 нм, обнаружению и использованию которого для количественного анализа тетрациклина в смесях не препятствуют ни бензилпенициллин, ни резорцин: у них нет поглощения в этой области. В то же время значения четвертой производной спектра тетрациклина в диапазоне 240–290 нм существенно меньше соответствующих значений бензилпенициллина и резорцина и практически не влияют на их оценки.

Таким образом, достаточно надежно можно определять концентрации всех трех исследованных фармакологических препаратов в смесях, сочетая анализы исходных спектров и их четвертых производных (см. рисунок, Г).

Выполненные в работе модельные эксперименты — лишь иллюстрация общего подхода комбинированного использования методов спектрального анализа веществ и их смесей, обладающих свойством поглощения света в ультрафиолетовом и видимом диапазонах длин волн.

Разработанные алгоритмы могут быть использованы и в других областях исследовательской и практической деятельности, где требуется проведение экспресс-анализов определенных видов химических соединений и их смесей.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА В РАСТЕНИЯХ *TARAXACUM KOK-SAGHYZ* R. МЕТОДОМ ЭПР-СПИНОВОГО ЗОНДА \*

Л. Ю. Мартиросян<sup>1,3</sup>, И. И. Барашкова<sup>2</sup>, Ю. Ц. Мартиросян<sup>1,3</sup>, М. В. Мотякин<sup>1,2</sup>, В. М. Гольдберг<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля, Москва

<sup>2</sup> Федеральний исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семёнова, Москва

<sup>3</sup> Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

✉ levon-agro@mail.ru

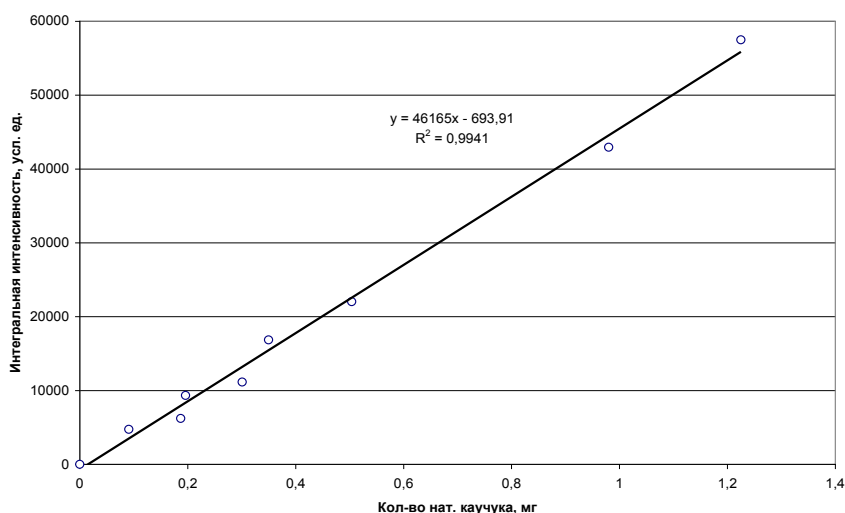
### Аннотация

При разработке количественного анализа натурального каучука (НК) было установлено, что нитроксильный радикал, 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО), введенный в порошок сухого корня кок-сагыза из газовой фазы, адсорбируется только в каучуконосных доменах растения. По магнитно-резонансным параметрам введенного нитроксильного радикала можно оценить процентное содержание каучуковых доменов в растениях.

Натуральный каучук (НК) — стратегически важный и ценный биополимер, востребованный для производства ~ 50 000 резиновых изделий. В настоящее время единственным коммерческим источником НК является каучуковое дерево (*Hevea brasiliensis*). Растущий спрос на НК в сочетании с опасностью гибели каучуковых плантаций в Юго-Восточной Азии, вызванный распространением болезней этой культуры, обусловил интерес ученых и производителей шин к поискам альтернативных источников НК, к которым принадлежит кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* R).

Целью данного исследования была разработка экспресс-оценки количественного содержания каучука в растениях *Taraxacum kok-saghyz* с помощью ЭПР-метода спиновых зондов. Количество НК в образцах, использованных для градуировки, определяли гравиметрическим методом.

После экстракции НК из корней кок-сагыза в оставшемся материале спектры ЭПР ТЕМПО зарегистрировать не удастся. Таким образом, радикал в растении избирательно сорбируется только на частицах каучука, что позволило разработать метод количественного анализа каучука непосредственно в корнях кок-сагыза. Результаты измерений позволяют построить градуировочную прямую (см. рисунок).



Зависимость интегральной интенсивности радикала ТЕМПО от количества натурального каучука в 7 мг сухого порошка корней кок-сагыза

Предложенный метод позволяет анализировать микроколичества (5–30 мг) образца. Статистический анализ данных, приведенных на рисунке, позволяет вычислить доверительный интервал 95 %-й надежности проведенных измерений. Он составляет 0,03 мг. Оценка доверительного интервала весового метода, использовавшегося для определения концентрации НК в изученных образцах, дает величину более 3 мг. Таким образом, чувствительность разработанного метода более чем на два десятичных порядка превышает чувствительность весового метода.

### Литература

1. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров / А. М. Вассерман, А. Л. Коварский; Отв. ред. А. Л. Бучаченко; АН СССР, Ин-т хим. физики. М.: Наука, 1986. 244 с.

## АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ И ДОКСОРУБИЦИНА НА КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ SK-N-BE(2) И hTERT

А. А. Мельникова<sup>1,2</sup>, Д. А. Балдов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск

<sup>2</sup>Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск

✉ angelik\_melnikova@mail.ru

### Аннотация

В ходе проведения исследования получены новые результаты о характере применяемых агентов на опухолевых клетках *in vitro*, что имеет важное практическое и теоретическое значение для понимания механизма сочетанного воздействия ионизирующего излучения и химиопрепарата доксорубицина.

Комбинированное действие ионизирующего излучения и химиотерапии часто применяется для повышения радиочувствительности опухолевых клеток при лечении резистентных форм злокачественных новообразований различных локализаций.

В свою очередь терапия протонными и углеродными пучками признана сегодня наиболее эффективной и прецизионной формой лучевой терапии глубоко расположенных опухолей, в том числе радиорезистентных.

Одним из самых востребованных в медицине антибиотиком является противоопухолевое лекарственное средство антрациклинового ряда доксорубицин. Доксорубицин применяется в протоколах лечения гиперплоидных опухолей, нейробластом групп низкого и промежуточного риска и может сочетаться с циклофосфамидом, карбоплатином и этопозидом, а также с лучевой терапией [1].

Объектами исследования являлись клеточные линии: hTERT (телемеризованные фибробласты человека), SK-N-BE(2) (нейробластома). Микроокружение опухоли играет важную роль в прогрессии и метастазировании. Оно включает в себя строму с фибробластами и эндотелиальными клетками сосудов. В связи с этим в рамках исследования дополнительно была выбрана клеточная линия фибробластов человека для цитотоксической оценки влияния химиопрепарата на здоровые клетки.

Целью научно-исследовательской работы является выявление закономерностей комбинированного действия ионизирующего излучения (ионы <sup>12</sup>C) и противоопухолевого антибиотика антрациклинового ряда на опухолевых и неопухолевых клетках человека.

Клетки инкубировали с препаратом доксорубицин в дозе 0,004 мг/мл (средняя терапевтическая доза в переводе на клетки) в течение 24 ч, затем облучали.

Облучение ионами <sup>12</sup>C проводили на ускорителе У-70 Института физики высоких энергий (ИФВЭ) ФГБУ ГНЦ РФ «Курчатовский институт» (г. Протвино) в дозах 1, 2, 4, 6 Гр. Облучение осуществлялось в водном фантоме со средней энергией 450 МэВ/нуклон. Средняя ЛПЭ излучения на начальном участке составила 11 кэВ/мкм, в пике 120–140 кэВ/мкм.

Для описания выживаемости клеточных культур, а также генетических и канцерогенных эффектов совместного действия ионизирующего излучения и повреждающих факторов существует концепция синергизма [2].

В ходе проведенной работы дана оценка влияния антибиотика антрациклинового ряда доксорубицина на исследуемых клеточных линиях. Для клеток фибробластов человека линии hTERT действие доксорубицина оказывает выраженное цитотоксическое действие и проявляется в виде двукратного увеличения времени, за которое популяция клеток увеличится вдвое. Продemonстрировано, что комбинированное действие тяжелых ионов и доксорубицина на клетки нейробластомы носит антагонистический характер при дозах 1 и 2 Гр.

### Литература

1. Strother D.R., London W.B., Schmidt M.L. et al. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641 // J. Clin. Oncol. 2012. Vol. 30 (15). P. 1842–1848.

2. Петин В. Г., Жураковская Г. П., Комарова Л. Н. Радиобиологические основы синергических взаимодействий в биосфере. М.: ГЕОС, 2012. 219 с.

**CONTRAST AGENTS FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING  
BASED ON HUMAN SERUM ALBUMIN AND SPATIALLY HINDERED NITROXIDES\***

D. E. Mitin<sup>1,2</sup>, S. A. Dobrynin<sup>3</sup>, K. D. Petrov<sup>1,2</sup>, I. A. Kirilyuk<sup>3</sup>, A. S. Chubarov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

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

<sup>3</sup>*N. N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk*

✉ d.mitin@g.nsu.ru

**Abstract**

Among the many imaging techniques for medical diagnosis, MRI is one of the most powerful methods because of its ability to noninvasively generate three-dimensional detailed anatomical images with high spatial resolution. Current clinical MRI techniques indicate the spatial distribution and chemical environment of aqueous protons. To enhance the differences between aqueous protons and the area of the tumor, the contrast agents are often used. Paramagnetic complexes with Gd<sup>3+</sup> or heavy metal oxides are used as contrast agents. The disadvantages of these substances are a rather high price and a number of side effects. The non-metal contrast agents for MRI are required for clinical diagnostics. The development of <sup>1</sup>H-MRI contrast agents containing nitroxyl radicals has recently appeared. These preparations are interesting because of their low toxicity and preserve the material base (tomograph coils) since they act by a similar mechanism as gadolinium agents. For the transport to the cancer tissue, we suppose to use Human serum albumin (HSA). HSA is the major protein in human plasma. HSA has unique properties which allow it to be used as a molecular probe for cancer diagnostics.

The aim of this work is to develop an efficient method of contrast agents' synthesis for cancer <sup>1</sup>H-MRI using conjugates based on HSA and nitroxyl radicals.

Various site-specific acylating agents based on the natural modifier homocysteine thiolactone were synthesized to obtain contrast agents. Protein labeling was performed under close to physiological conditions. The albumin modification degree was determined using electron paramagnetic resonance (EPR) and MALDI ToF MS spectroscopy. Spatially hindered nitroxyl radicals were used because they exhibit increased resistance to a reduction in biological systems. Circular dichroism was used to establish the number of alpha helix and beta layers in the modified albumin. The dynamic light scattering method was used to establish the particle size. The absence of protein oligomerization was shown by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. The MTT cytotoxicity test was performed to confirm the lack of toxicity of contrast agents.

Relaxivity parameters  $r_1$  and  $r_2$  indicate the level of sensitivity in recording  $T_1$  (spin-spin relaxation time) and  $T_2$  (spin-lattice relaxation time) weighted MRI images. Relaxivities  $r_1$  and  $r_2$  are similar for conjugates and much larger than their individual components. The MRI phantom in vitro experiment was performed which indicate the perspectives of albumin conjugated for both  $T_1$  and  $T_2$  weighted images.

---

\*The research was performed with the financial support of RSF, project No. 21-74-00120, and grant of the President of the Russian Federation CII-4330.2021.4.

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ СПИННОГО МОЗГА НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ *SOD1* МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

В. О. Морева

*Санкт-Петербургский государственный университет*

✉ 00htlf00@gmail.com

### Аннотация

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — идиопатическое нейродегенеративное заболевание, сопровождающееся гибелью центральных и периферических мотонейронов, неуклонным прогрессирующим с последующей инвалидизацией и летальным исходом в течение 5 лет. В настоящее время отсутствуют эффективные средства профилактики и лечения БАС, что обуславливает актуальность изучения проблемы для современной медицины. Развитие знаний о БАС также позволит разработать ранние и специфические диагностические методы для выявления данного заболевания.

### Цель исследования

Оценить морфофункциональный статус трансгенных *SOD1-G93A* мышей, экспрессирующих фенотип БАС, на различных стадиях развития заболевания посредством электронной микроскопии.

### Материалы и методы

Образцы спинного мозга фиксировали в 2,5 % глутаральдегиде в 100 мм PBS в течение 24 ч при 4 °С. После фиксации клетки обрабатывали 1 %-м тетраоксидом осмия в течение 1 ч и затем обезжировали с использованием этанола при концентрациях от 30 до 96 % в течение 10 мин, ацетона, а затем проводили окончательную обработку в окиси пропилена в течение 20 мин перед встраиванием в смолу Epon 812. После полимеризации смолы при 37, 45 и 60 °С образцы разрезали на полу- и ультратонкие срезы с помощью ультрамикротомы. Секции монтировались на медных решетках, и были добавлены контрастные вещества уранилацетат 2 % и цитрат свинца. Ультратонкие срезы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа при 100 кВ. Для проведения мультиплексного анализа была использована панель Bio-Plex Pro™ Mouse Chemokine Panel 33-Plex для анализа хемокинов мыши.

### Результаты

Ультраструктурный анализ серого вещества передних рогов спинного мозга *SOD1-G93A* мыши на различных стадиях развития заболевания показал, что уже на стадии доклинических проявлений сохранность тканей частично снижается. Так, среди частично дезинтегрированных или полностью дегенерировавших и представленных просветленными областями нервных волокон визуализируются мотонейроны с признаками апоптоза и реактивные астроциты. На стадии клинических проявлений ультраструктурный анализ показал присутствие небольшого количества дегенерировавших мотонейронов с дезинтегрированной цитоплазмой среди полностью дегенерировавших и представленных просветленными областями нервных волокон. На терминальной стадии развития заболевания показаны значительные дегенеративные изменения в тканях. Ткань серого вещества состоит из дезинтегрированного вещества, выглядящего гомогенным, очертания каких-либо отростков не определяются.

Проведен мультиплексный анализ уровня цитокинов воспаления в сыворотке крови мышей на различных стадиях заболевания по сравнению с диким типом мышей. Показано достоверное повышение лишь двух цитокинов воспаления IL-6, MCP-1 у мышей терминальной стадии БАС и увеличение IL-1 $\beta$  на стадии доклинических проявлений.

### Вывод

Показано, что развитие бокового амиотрофического склероза у модельных животных сопровождается прогрессирующей дегенерацией мотонейронов и нервных волокон, образованием реактивной микроглии, постепенной дегенерацией астроцитов и олигодендроцитов по мере развития заболевания.

Проведен анализ уровня цитокинов воспаления в сыворотке крови мышей на различных стадиях заболевания по сравнению с диким типом мышей. Показано достоверное повышение лишь двух цитокинов воспаления IL-6, MCP-1 у мышей терминальной стадии БАС и увеличение IL-1 $\beta$  на стадии доклинических проявлений.

## БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ СВЕЧЕНИЯ СВЕТЛЯКОВ И НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Е. П. Морозова<sup>1</sup>, Т. Е. Смолярова<sup>1,2</sup>, Р. Ранджан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр СО РАН

✉ e.p.morozova-bf@mail.ru

### Аннотация

В данной работе исследовали влияние наночастиц серебра и золота на биолюминесцентную систему светляков, а также на экстракцию АТФ из бактериальных клеток. Было показано, что использование золотых наночастиц приводит к усилению биолюминесцентного сигнала, что можно объяснить теорией FRET-эффекта.

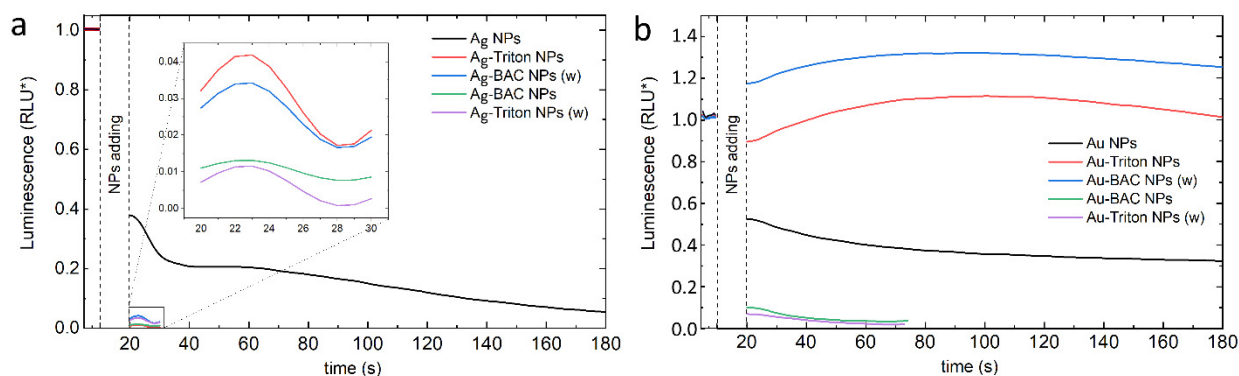
Одной из актуальных проблем биологии является разработка новых экспрессных и доступных биосенсоров для экотоксикологии. Однако для этого необходима разработка простого и доступного биологического модуля. Одним из возможных решений является разработка биологического модуля на основе биолюминесцентной системы светляков. Такая система обладает рядом преимуществ: высокий квантовый выход, чувствительность, простота и безопасность. Благодаря высокой чувствительности люциферин-люциферазной системы светляков к АТФ она применяется для определения количественного содержания АТФ в различных образцах. Анализ количественного содержания АТФ помогает определить наличие или отсутствие микробного загрязнения, что может быть использовано в прикладных областях.

В данной работе использовались для экстракции растворы, содержащие золотые и серебряные наночастицы, стабилизированные детергентами ВАС (бензалконий хлорид) и Triton (Triton X-100). Было высказано предположение, что экстрагирующий буфер на основе наночастиц металлов, стабилизированных детергентами, более эффективен, чем буфер на основе этих же детергентов. Использование наночастиц, стабилизированных и покрытых детергентами, должно увеличить площадь контакта детергентов с клеточной мембраной, повысить эффективность лизиса бактериальных клеток.

Наночастицы серебра были получены путем добавления боргидрида натрия к водному раствору, содержащему нитрат серебра и детергенты. Наночастицы золота были получены теми же способами, но с использованием тетрахлорауровой кислоты. После этого наночастицы металлов промывали и использовали для экстракции АТФ. Измерения проводили сразу после смешивания суспензии бактерий и экстрагирующего буфера и через 10 минут после начала экстракции.

Было показано, что наночастицы серебра приводят к ингибированию биолюминесцентной системы, которое увеличивается с присутствием стабилизирующих детергентов. При этом установлено, что использование наночастиц золота более эффективно при проведении данного анализа. Также установлено, что после добавления отмытых наночастиц золота, стабилизированных ВАС, и неотмытых наночастиц золота, стабилизированных Triton, биолюминесцентный сигнал увеличивался в течение первого часа. Это указывает на то, что в течение первого часа молекулы АТФ продолжают вступать в люциферин-люциферазную реакцию.

При изучении влияния наночастиц на биолюминесцентную систему (см. рисунок) мы обнаружили, что промытые наночастицы золота, стабилизированные ВАС, и не отмытые наночастицы золота, стабилизирован-



Влияние наночастиц серебра (a) и золота (b) на биолюминесцентную систему

ные Triton, усиливают биолюминесцентный сигнал. Это можно объяснить теориями FRET-эффекта и эффекта усиления флуоресценции металлами. Таким образом, при использовании наночастиц золота чувствительность биосенсора на основе реакции свечения светляков может быть увеличена.

#### **Литература**

1. Eltzov E., Prilutsky D., Kushmaro A. et al. Metal-enhanced bioluminescence: An approach for monitoring biological luminescent processes // *Appl. Phys. Lett.* 2009. Vol. 94. <https://doi.org/10.1063/1.3086283>.
2. Li S., Ruan Z., Zhang H., Xu H. Recent achievements of bioluminescence imaging based on firefly luciferin-luciferase system // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. Vol. 211. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113111>.
3. Davidson Craig A. An evaluation of some microbiological and ATP bioluminescence methods for the recovery and detection of bacterial contamination from food contact and environmental surfaces. 2001. <http://hdl.handle.net/10369/5901> (accessed December 3, 2021).

## ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫМИ ЭМБРИОНАМИ МЫШИ МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ МЕТОК\*

А. Н. Омельченко<sup>1,3</sup>, Т. Н. Игонина<sup>2</sup>, Е. И. Брусенцев<sup>2,3</sup>,  
К. А. Окотруб<sup>3</sup>, С. И. Амстиславский<sup>2,3</sup>, Н. В. Суровцев<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup>Институт автоматизации и метрологии СО РАН, Новосибирск

✉ a.omelchenko@g.nsu.ru

### Аннотация

При изучении воздействия среды на одиночные клетки возникает вопрос характеристики клеточного метаболизма. Порой необходимо использовать бесконтактные и неразрушающие методики, позволяющие достаточно просто описать внутриклеточные процессы. Одной из таких методик является комбинационное рассеяние света дейтерированных меток (D-KPC). В данной работе рассматривается возможность применения D-KPC к исследованию накопления дейтерированных соединений в эмбрионах мыши. В результате экспериментов выявлены изменения в липидном обмене при криоконсервации. Показано, что с помощью D-KPC возможно достаточно просто выявить изменения в клеточном метаболизме одиночных клеток.

Исследование состояния клетки невозможно без характеристики клеточного метаболизма. С изменением условий окружающей среды внутри клетки происходит смена ее метаболических путей, метаболитов. Для того чтобы охарактеризовать тот или иной метаболический путь, можно отследить накопление специфичных для него соединений, что достигается использованием изотопных меток. Детектировать меченые молекулы возможно с помощью метода D-KPC. Он является неинвазивным, неразрушающим, требует минимальную пробоподготовку, а также применим в работе с одиночными клетками.

В данной работе исследуется возможность применения D-KPC для изучения метаболических цепочек в клетках эмбрионов мыши. Для этого эмбрионы культивировались в средах с содержанием различных дейтерированных соединений, таких как вода, стеариновая кислота, глюкоза и аминокислоты (фенилаланин и лейцин). Эмбрионы мыши были подготовлены сотрудниками сектора криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН.

На примере дрожжевых клеток была продемонстрирована принципиальная возможность изучения метаболических процессов в химических реакциях с участием молекул воды. Показано, что при культивировании эмбрионов в тяжелой воде не образуется новых дейтерированных соединений, что может быть связано с ее токсичностью для клеток. В спектрах КРС эмбрионов, выращенных в среде с содержанием дейтерированной стеариновой кислоты, обнаружены линии, соответствующие дейтерированным липидам ( $2105 \text{ см}^{-1}$ ). С помощью метода главных компонент из общего спектра удалось выделить липидный вклад. Это позволило оценить уровень обогащения клеток дейтерированными липидами по отношению пиков, соответствующих дейтерированным и недеютерированным липидам. Показано, что в контрольной группе новые, дейтерированные, липиды составляют примерно 13 % от липидома. Было обнаружено, что эмбрионы, развитые до стадии морулы после криоконсервации, могут накапливать большее количество дейтерированной стеариновой кислоты по сравнению с плохо развивающимися эмбрионами. Была продемонстрирована возможность расширения применения данного подхода на другие соединения. Получены спектры при культивировании эмбрионов в средах с содержанием дейтерированных глюкозы и аминокислот.

Таким образом, в работе показано, что D-KPC является относительно простой методикой, позволяющей выявлять изменения в клеточном метаболизме одиночных клеток.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-74-10108.



## ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ФОКУСОВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H2AX В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТРИТИРОВАННОЙ ВОДЫ\*

А. А. Осипов<sup>1</sup>, М. В. Пустовалова<sup>2</sup>, А. К. Чигасова<sup>1,3</sup>, Н. Ю. Воробьева<sup>1,2</sup>,  
Д. И. Кабанов<sup>2</sup>, О. А. Кочетков<sup>2</sup>, В. Г. Барчуков<sup>2</sup>, А. Н. Осипов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва

<sup>2</sup>Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна  
Федерального медико-биологического агентства России, Москва

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

✉ a-2-osipov@yandex.ru

### Аннотация

В работе представлены результаты исследования количественных изменений маркера двуниевых разрывов ДНК — фокусов фосфорилированного гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX) в культивируемых мезенхимальных стромальных клетках (МСК) человека при воздействии тритированной воды с низкой удельной активностью (100–400 МБк/л) в течение 24–72 ч. Дополнительно был проведен анализ изменений пролиферативной активности МСК и оценка включения трития в клеточные структуры.

Радиоактивный изотоп водорода тритий образуется в результате как природных, так и техногенных процессов, таких как работа атомных электростанций (АЭС). В замедлителях и теплоносителях тяжеловодных реакторов АЭС тритий в основном существует в виде тритированной (тритиево-протиевой) воды (НТО). Часть трития НТО обменивается с атомами протия и включается в различные органические молекулы (азотистые основания, аминокислоты, липиды, сахара и т. д.).

Атомные электростанции регулярно выбрасывают НТО в окружающую среду в концентрациях ниже предельно допустимых. Однако существуют подтвержденные данные, что около атомных электростанций происходили аномальные выбросы воды, содержащей тритий, что привело к серьезному загрязнению подземных вод. До сих пор нет единого мнения международного сообщества по вопросам нормирования поступления соединений трития в организм человека. Существующая неопределенность привела к несоответствиям в спецификации стандартов питьевой воды по тритию. Например, согласно Европейским нормам, удельная радиоактивность соединений трития в питьевой воде для населения не должна превышать 100 Бк/л, тогда как в Австралии нормой являются 75 000 Бк/л [1].

Пробег испускаемой тритием низкоэнергетической  $\beta$ -частицы составляет 0,4–0,6 мкм, что намного меньше диаметра ядра соматической клетки. Попадание соединений трития в организм человека с вдыхаемым воздухом, водой или пищей приводит к поступлению его в клетки и ткани и может вызывать повреждения ДНК, среди которых наиболее критичными являются двуниевые разрывы (ДР ДНК). Клеточный ответ на повреждение ДНК напрямую зависит от числа накопленных ДР и может включать такие процессы, как остановка клеточного цикла, активация процессов репарации ДНК и запуск программ клеточной гибели [2, 3]. Некорректная репарация ДНК от ДР приводит к цитогенетическим нарушениям, инактивации генов опухолевых супрессоров и активации онкогенов [4].

Целью настоящей работы было изучение количественных изменений маркера ДР ДНК — фокусов белков  $\gamma$ H2AX в культивируемых мезенхимальных стромальных клетках (МСК) человека при длительном воздействии НТО с удельной активностью 100–400 МБк/л. Дополнительно была проведена оценка изменения пролиферативной активности МСК при их инкубации с НТО, а также изучено включение трития в клеточные структуры.

В результате исследования было показано, что статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение фокусов  $\gamma$ H2AX в МСК инкубированных с оксидом трития наблюдалось только в активно пролиферирующих клетках в первые 24 ч инкубации в среде с удельной радиоактивностью 300 и 400 МБк/л, после чего с уменьшением пролиферативной активности снижалось до контрольных значений.

При инкубации контрольных клеток наибольшая пролиферативная активность наблюдается 24 ч, после чего отмечается снижение пролиферативной активности на 48 и 72 ч вследствие контактного ингибирования клеточного роста. В исследованных концентрациях НТО не влиял на пролиферативную активность МСК.

При оценке распределения радиоактивности в ядре и цитоплазме клеток показано, что НТО распределяется в процентном соотношении: 16 % ядро и 84 % цитоплазма. За 24 ч инкубации с НТО с удельной активностью от 100 до 400 МБк/л клетки получали расчетные дозы от 7,78 до 31,13 мГр соответственно.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-2400490.

Результаты сравнительной оценки количественного выхода фокусов  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  при воздействии НТО и рентгеновского излучения показали, что относительная биологическая эффективность НТО примерно в 1,8 раза выше, чем при воздействии рентгеновского излучения. Полученное значение хорошо согласуется с литературными данными [5, 6].

#### Литература

1. Flegal M., Blimkie M., Roch-Lefevre S. et al. The lack of cytotoxic effect and radioadaptive response in splenocytes of mice exposed to low level internal beta-particle irradiation through tritiated drinking water *in vivo* // International Journal of Molecular Sciences. 2013. V. 14(12). P. 23791–23800.
2. Osipov A.N., Grekhova A., Pustovalova M. et al. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation // Oncotarget. 2015. V. 6. P. 26876–26885.
3. Babayan N., Vorobyeva N., Grigoryan B. et al. Low Repair Capacity of DNA Double-Strand Breaks Induced by Laser-Driven Ultrashort Electron Beams in Cancer Cells // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. P. 9488.
4. Halazonetis T.D., Gorgoulis V.G., Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development // Science. 2008. V. 319. P. 1352–1355.
5. Kozlowski R., Bouffler S.D., Haines J.W. et al. In utero haemopoietic sensitivity to alpha, beta or X-irradiation in CBA/H mice // Int. J. Radiat. Biol. 2001. V. 77. P. 8005–8015.
6. Little M.P., Lambert B.E. Systematic review of experimental studies on the relative biological effectiveness of tritium // Radiat. Environ. Biophys. 2008. V. 47. P. 71–93.

## ВЛИЯНИЕ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ НА Фолликулярный аппарат щитовидной железы крыс в возрастном аспекте

Д. А. Пешкова<sup>1</sup>, Д. Р. Соляникова<sup>2</sup>, Е. С. Головнева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Многопрофильный центр лазерной медицины, Челябинск

<sup>2</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск

✉ da.peshkova@outlook.com

### Аннотация

Было изучено влияние фотобиомодуляции (ФБМ) на фолликулярный аппарат щитовидной железы (ЩЖ) крыс в возрастном аспекте. Установлено, что продолжительность и характер активации фолликулярного аппарата после лазерного воздействия имеет зависимость от возрастных особенностей. Полученные данные у старых животных указывают на необходимость дополнительного лазерного воздействия для достижения продолжительного эффекта.

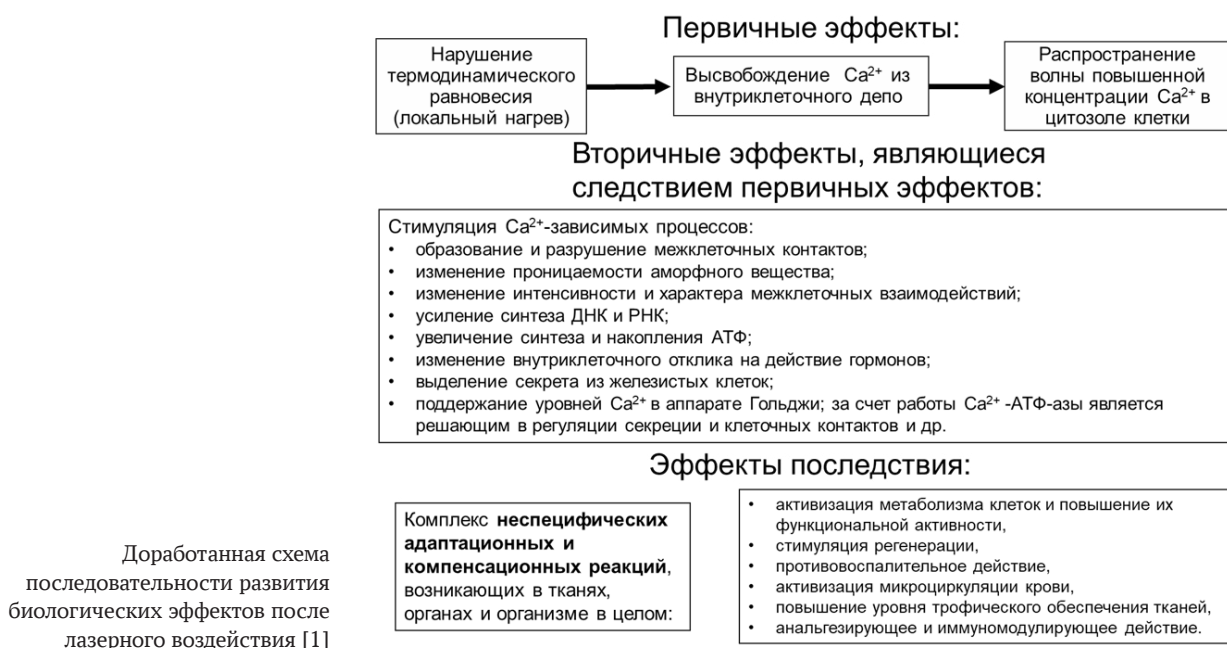
Благодаря экспериментальным исследованиям постоянно расширяется диапазон доказанных терапевтических эффектов использования ФБМ, что значительно увеличивает область неинвазивной терапии, в том числе для лечения гипотиреоза. ФБМ зарекомендовала себя как надежный инструмент в стимуляции к регенерации, улучшению микроциркуляции и активации метаболизма клеток с последующим повышением их функциональной активности. При этом характер и интенсивность воздействия на ткань зависит от свойств ткани и лазерного излучения. Действие ФБМ обусловлено взаимодействием фотонов с молекулами и соединениями молекул ткани (в основном  $\text{Ca}^{2+}$ ), последующими молекулярными процессами и биологическими реакциями.

Целью исследования является анализ влияния инфракрасного лазерного воздействия на морфофункциональные показатели фолликулярного аппарата ЩЖ крыс в возрастном аспекте.

В рамках данной работы были исследованы две возрастные группы: молодые половозрелые животные и старые животные. Выведение из эксперимента осуществлялся через 1 час, на 1-е, 3-и и 7-е сутки после лазерного воздействия на область локализации ЩЖ. После классических гистологических методик оценивались гистологические препараты ЩЖ на морфометрической установке.

Были выявлены следующие изменения: ФБМ на ЩЖ молодых животных приводит к продолжительному повышению функциональной активности тироцитов, что нашло свое проявление в уменьшении площади коллоида и диаметра фолликулов, увеличении высоты клеток и диаметра их ядер, уменьшении ядерно-цитоплазматического соотношения.

Однократное лазерное воздействие низкой интенсивности на ЩЖ у старых животных приводит к повышению функциональной активности тироцитов с последующей их стабилизацией (на 7-е сутки), что находит свое



проявление в уменьшении площади коллоида и диаметра фолликулов, увеличении высоты клеток, уменьшении диаметра их ядер и ядерно-цитоплазматического соотношения.

Повышение функциональной активности тироцитов происходит за счет ряда последовательных эффектов, наблюдаемых после ФБМ, которые представлены на рисунке. Нарушение термодинамического равновесия (локальный нагрев) вызывает мгновенное высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточного депо в гиалоплазму клеток ЩЖ, что является стимуляцией к возникновению вторичных эффектов. Повышение концентрации кальция в эндотелии ранее расширенных кровеносных сосудов из-за локального нагрева приводит к кальцийзависимому выделению данными клетками оксида азота — предшественника фактора вазодилатации, стимулирующего пролонгирование расширения кровеносных сосудов [2]. Также выброс кальция стимулирует повышение дегрануляционной активности тучных клеток, которые вырабатывают целый спектр биологически активных веществ паракринного действия [3].

Полученные данные существенно расширяют представление о возможности лечения гипотиреоза, в том числе возрастного генеза, и дополняют сведения о воздействии лазерного излучения с эндокринными органами.

### Литература

1. Москвин, С. В. Эффективные методики лазерной терапии / С. В. Москвин, А. В. Кочетков. М.; Тверь: Триада, 2016. 80 с. ISBN 978-5-94789-741-8.
2. Hamblin M.R. Photobiomodulation or low-level laser therapy // J. Biophotonics. 2016. № 9 (11–12). P. 1122–1124. doi:0.1002/jbio.201670113. PMID: 27973730; PMCID: PMC5215795.
3. Смелова И. В. Изучение морфофункциональных изменений фолликулов щитовидной железы крыс в норме и при гипотиреозе после воздействия среднеинтенсивного лазерного излучения / И. В. Смелова, Е. С. Головнева // Вестн. Росс. гос. мед. ун-та. 2018. № 3. — С. 67–74. DOI 10.24075/vrgmu.2018.028. EDN YBKKRN.

## МНОГОКРАТНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ПРОТЕОГЛИКАНОВ И СНИЖАЕТ СОДЕРЖАНИЕ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

М. О. Политко<sup>1</sup>, Д. К. Соколов<sup>1</sup>, О. А. Пашковская<sup>2</sup>, А. А. Жеравин<sup>2</sup>, Э. В. Григорьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики  
ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск

✉ politko.nsu@gmail.com

### Аннотация

В настоящее время глиобластома является неизлечимой злокачественной опухолью головного мозга. Существующая схема лечения, состоящая из хирургического удаления опухоли с последующим курсом радиохимиотерапии, является неэффективной, и чаще всего развивается рецидив заболевания, вызывающий летальный исход. В данный момент рассматриваются многие принципиально новые методы лечения глиобластомы и разрабатываются новые лекарственные средства или методы воздействия на злокачественную опухоль. Альтернативный подход заключается в изучении причин недостаточной эффективности применяемой в настоящий момент схемы лечения и выявлении новых молекулярных механизмов, которые могут влиять на развитие рецидива заболевания.

В данной работе были изучены негативные побочные эффекты воздействия химиолучевой терапии глиобластомы на нормальную ткань головного мозга, окружающую опухоль, и их вклад в развитие рецидива заболевания. Известно, что химиолучевая терапия оказывает значительное воздействие не только на клетки глиобластомы, но и на окружающую здоровую ткань головного мозга, тем самым снижая ее способность противодействовать пролиферации остаточных клеток глиобластомы и развитию рецидива заболевания. Важную роль в развитии опухолей и их инвазии в окружающую здоровую ткань играет внеклеточный матрикс (ВКМ), который в головном мозге занимает около 20 % объема мозга взрослого человека, а его молекулы играют важную роль в развитии нейронов, пластичности и патофизиологии головного мозга. Известно, что ВКМ головного мозга характеризуется большим содержанием сложных белково-углеводных молекул — протеогликанов (ПГ).

Целью работы являлось изучение долгосрочных эффектов пятикратного рентгеновского облучения на экспрессию коровых белков основных ПГ и содержание углеводных цепей хондроитинсульфата (ХС) в коре и внеклеточных структурах нормальной ткани головного мозга экспериментальных животных.

В работе были использованы мыши линии C57Bl/6, которых подвергали многократному облучению (пять раз в течение пяти дней с разовой дозой 7 Гр) на приборе Small Animal Radiation Therapy (SmART+) system (Precision Inc., USA). Для усыпления животных использовали комбинацию препаратов золетил и домитор, в качестве контрольных животных были использованы мыши, которых усыпляли аналогичной дозой препаратов в течение пяти дней. Уровень экспрессии коровых белков ПГ (синдекан-1, глипикан-1, перлекан, декорин, бигликан, агрекан, версикан, нейрокан, CSPG4/NG2, CSPG5, фосфакан) определяли ОТ-ПЦР в реальном времени, содержание углеводных молекул ХС — методом дот-блот со специфическими антителами.

Было показано, что в долгосрочной перспективе (10–38 дней) пятикратное облучение мозга мышей приводит к снижению в 1,2–1,6 раз ( $p < 0,05$ ) общей транскрипционной активности генов, кодирующих коровые белки ПГ, в коре и внеклеточных структурах головного мозга животных. Этот эффект в основном обеспечивался за счет значительного подавления в 2,1–3,2 раза ( $p < 0,05$ ) транскрипционной активности гена CSPG5, который являлся самым экспрессируемым геном в мозге мышей. Однако в последующем периоде (52–66 дней после облучения) происходило восстановление и даже повышение общего уровня экспрессии ПГ в 1–1,7 раз ( $p < 0,05$ ) и в коре, и во внеклеточных структурах головного мозга.

Поскольку коровый белок протеогликана CSPG5 несет на себе углеводные цепи хондроитинсульфата, было изучено влияние пятикратного облучения на их содержание в коре и внеклеточных структурах головного мозга мышей. Показано, что кора головного мозга быстрее реагировала на многократное облучение (10–38 день) снижением содержания ХС в 2–4,7 раза ( $p < 0,05$ ), а внеклеточные структуры мозга характеризовались более отсроченным (24–52 день) снижением содержания ХС — в 2,2–3,7 раза ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, было показано, что многократное облучение приводит к снижению общей транскрипционной активности коровых белков ПГ в головном мозге мышей, в основном за счет CSPG5, и к снижению содержания их углеводных цепей ХС. При этом и кора, и внеклеточные структуры головного мозга оказались чув-

ствительны к облучению. Наблюдаемые изменения могут приводить к реорганизации внеклеточного матрикса головного мозга, что может ослаблять способность нормальной ткани мозга влиять на пролиферацию остаточных опухолевых клеток и способствовать развитию рецидива глиобластомы.

Обнаруженные изменения говорят о новом потенциальном молекулярном механизме негативного влияния радиотерапии на нормальную ткань головного мозга. Изучение молекулярных механизмов повреждения нормальной ткани головного мозга под действием рентгеновского облучения может позволить разработать стратегии ослабления побочных эффектов лечения и повышения продолжительности и качества жизни пациентов с глиобластомой.

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНАЦИИ НА ОСНОВЕ ФДТ-ИНДУЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ GL261 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕТРА(АРИЛ)ТЕТРАЦИАНОПОРФИРАЗНОВ\*

Т. С. Редькин<sup>1</sup>, М. О. Савюк<sup>1</sup>, Е. Е. Слепцова<sup>1</sup>, В. Д. Турубанова<sup>1,2</sup>, М. В. Ведунова<sup>1</sup>, Д. В. Крысько<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup>Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT),

факультет анатомии и реабилитации человека, Гентский университет, Гент, Бельгия

<sup>3</sup>Институт исследований рака, Гент, Бельгия

✉ big.t.nsdav@outlook.com

### Аннотация

На сегодняшний день не разработано оптимальных методов терапии онкологических заболеваний, которые бы обеспечивали полное выздоровление и отсутствие повторной манифестации. Модель иммуногенной клеточной смерти (ICD) подразумевает активацию иммунной реакции, направленной на малигнизированные клетки, как результат испускания мертвыми/умирающими клетками молекул, ассоциированных с повреждением (DAMPs). Одним из методов, способных вызвать ICD, является фотодинамическая терапия (ФДТ).

Целью стала разработка модели для оценки способности активации специализированного противоопухолевого иммунитета при использовании ФДТ *in vivo*.

Клеточная линия глиомы (GL261) культивируется в полной питательной среде DMEM (10 % сыворотки крови, L-глутамин, пенициллин 1 %, стрептомицин 1 %) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с поддержанием влажности и температуры. Для фотодинамического воздействия используются фотосенсибилизаторы тетра(арил)тетрацианопорфиразны с разными арильными заместителями (pz I–IV). Клеточная линия GL261 инкубируется в бессывороточной среде с добавлением одного из выбранных порфиразинов в течение 4 часов, затем питательная среда заменяется на полную, клетки подвергаются фотодинамической активации в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> и далее инкубируются 24 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Вакцинация мышей предполагает подкожное введение умирающих/мертвых клеток глиомы после фотодинамического воздействия с промежутком введения 7 дней. С одной стороны мыши вводятся вакцина, а с другой — живые опухолевые клетки. Наличие и развитие опухолевого очага производится путем измерения объема опухоли на прививаемой стороне на протяжении 28–32 дней. Наблюдалось подавление развития опухолевого очага для каждого из выбранных порфиразинов. При использовании pz I выживаемость составила 90 %, pz II — 100 %, pz III — 70 %, pz IV — 100 %.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00716, <https://rscf.ru/project/22-25-00716>.  
© Т. С. Редькин, М. О. Савюк, Е. Е. Слепцова, В. Д. Турубанова, М. В. Ведунова, Д. В. Крысько, 2022

## ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ПРОНИКНОВЕНИЕ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МИТОХОНДРИЯМИ НОВЫХ КОНЬЮГАТОВ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ\*

Т. И. Салихова<sup>1</sup>, А. В. Лайков<sup>1</sup>, Р. А. Ишкаева<sup>1</sup>, Т. И. Абдуллин<sup>1</sup>,  
О. В. Цепаева<sup>2</sup>, В. Ф. Миронов<sup>1,2</sup>, А. В. Немтарёв<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup>Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, Казань

✉ taliya.salikhova@mail.ru

### Аннотация

Получены новые конъюгаты бетулиновой кислоты с трифенилфосфониевыми и гликозидными группами. Исследовано влияние функциональных групп на внутриклеточное проникновение, цитотоксичность конъюгатов и их взаимодействие с митохондриями опухолевых клеток.

Актуальной биомедицинской проблемой является создание соединений, специфически воздействующих на функциональную активность митохондрий, в качестве потенциальных цитотоксических и цитомодулирующих препаратов. Перспективным подходом является конъюгация природных соединений с векторными группами, выполняющими функцию доставки в опухолевые клетки и митохондрии.

Ранее нами были синтезированы конъюгаты тритерпеноидов и (ацетил)салициловой кислоты с трифенилфосфониевыми (ТФФ) группами, которые проявили усиленные антибактериальные и противоопухолевые свойства *in vitro* [1, 2]. Целью настоящего исследования явилась оценка потенциала новых мультифункциональных конъюгатов на основе тритерпеноида бетулиновой кислоты (БК), модифицированной глюкопиранозой и другими гексозами в положении С-3, наряду с ТФФ-группой в положении С-28, в качестве клеточных и митохондриальных модуляторов.

По данным МТТ-теста, гликозидные остатки повышали цитотоксичность ТФФ-конъюгатов БК в отношении опухолевых клеток (РС-3, МСF-7, Сасо-2 и др.). Был оптимизирован tandemный ВЭЖХ-масс-спектрометрический анализ соединений в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с использованием масс-спектрометра QTRAP 6500. С помощью оптимизированного анализа проведено сравнительное исследование внутриклеточного проникновения соединений, показавшее, что конъюгаты с гликозидными группами усиленно накапливаются в опухолевых клетках до 50 раз более эффективно по сравнению с немодифицированной БК.

По данным флуоресценции индикаторов TMRE и MitoSOX гликозилированные и негликозилированные ТФФ-конъюгаты БК индуцировали выраженную деполаризацию митохондриальной мембраны и продукцию активных форм кислорода. При этом гликозидный остаток в зависимости от структуры модулировал митохондриальные эффекты конъюгатов и придавал им некоторую антиоксидантную активность. Полученные результаты демонстрируют, что конъюгаты БК с ТФФ и гликозидной группами являются перспективной структурной основой для создания новых модуляторов митохондрий, обладающих усиленной активностью в отношении опухолевых клеток.

### Литература

1. Tsepaeva O.V. et al. Synthesis, anticancer and antibacterial activity of betulonic and betulonic acid C-28 triphenylphosphonium conjugates with variable alkyl linker length // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 20. P. 286–300.
2. Tsepaeva O.V. et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of triphenylphosphonium derivatives of acetylsalicylic and salicylic acids: structure-dependent interactions with cancer cells, bacteria and mitochondria // *Medicinal Chemistry Research*. 2021. Vol. 30. P. 925–939.

\* Масс-спектрометрическое исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-10105) с использованием оборудования Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ.

© Т. И. Салихова, А. В. Лайков, Р. А. Ишкаева, Т. И. Абдуллин, О. В. Цепаева, В. Ф. Миронов, А. В. Немтарёв, 2022



## ИССЛЕДОВНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИЦИРРИЗИНА С ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНОЙ И ТРАНСМЕМБРАННЫМ ДОМЕНОМ Е-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА МЕТОДАМИ <sup>1</sup>H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ\*

О. Ю. Селютина<sup>1</sup>, П. А. Кононова<sup>1,2</sup>, Н. Э. Поляков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ olga.gluschenko@gmail.com

### Аннотация

Глицирризин является основным активным компонентом корня солодки и обладает широким спектром биологической активности. Имеется много данных о его противовирусной активности, в том числе в отношении SARS-коронавирусов. В данной работе исследовалась возможность взаимодействия глицирризина с липидной мембраной, а также с трансмембранным доменом Е-белка коронавируса внутри липидной мембраны.

Глицирризиновая кислота (ГК, глицирризин) является основным активным компонентом корня солодки. Глицирризин обладает широким спектром биологической активности. Имеется много данных о противовирусной активности глицирризина, в том числе об активности в отношении SARS-коронавируса [1]. Механизм его противовирусного действия остается неясным, однако предполагается, что оно обусловлено взаимодействием ГК с липидной оболочкой вирусов. Одним из возможных механизмов противовирусного действия глицирризина в отношении коронавируса считается предотвращение слияния оболочки вируса с плазматической мембраной клетки-хозяина. В связи с серьезной эпидемической ситуацией в настоящее время продолжается поиск перспективных лекарственных препаратов, активных против SARS-CoV-2. Ряд исследований указывает на перспективность использования различных ингибиторов слияния вирусных частиц с плазматической мембраной клетки. Хотя большая часть этих исследований связаны с S-протеином вируса, который связывается с клеточной мембраной носителя, наличие у коронавируса липидной оболочки позволяет предполагать, что ингибиторы липидопосредованного слияния мембран также могут быть перспективными противовирусными агентами.

По некоторым данным, ингибирование синтеза Е-белка приводит к снижению выхода вирусных частиц из клетки, однако роль его в функционировании вирусных частиц остается не ясна [2]. Клетки, инфицированные коронавирусом, имеют деформации мембранных структур. Предполагается, что такие перестройки мембраны связаны с функциями Е-белка, который, встраиваясь в мембрану клетки-хозяина, индуцирует искривление мембраны и слипание двух мембранных [3]. Кроме того, данный белок относится к виropоринам. Блокирование ионных каналов, которые формируют олигомеры Е-белка, связывают со снижением репликации коронавируса [4, 5]. В настоящее время уже ведутся работы по исследованию структуры и функций белка SARS-CoV-2 Е, а также его взаимодействия с различными ингибиторами растительного происхождения. В том числе проверяется гипотеза таргетного воздействия ГК на Е-белок коронавируса.

Взаимодействие глицирризина с модельными липидными мембранами изучали методами ЯМР-спектроскопии. В качестве модели мембраны использовали липосомы и бицеллы различного состава. Характеризация взаимодействия ГК с липидной мембраной проводилась посредством измерения времен спин-спиновой и спин-решеточной релаксации, а также посредством NOESY-спектроскопии. Трансмембранный домен Е-белка SARS-CoV-2 (ETM) использовался для изучения действия глицирризина на вирусные белки. Показано, что ГК способна встраиваться в липидные мембраны, изменяя их свойства. Обнаружено, что мембраномодифицирующая активность ГК существенно зависит от pH среды. Также эксперименты показали наличие взаимодействия между глицирризином и трансмембранным доменом Е-белка SARS-CoV-2.

### Литература

1. Chrzanowski J., Chrzanowska A., Graboń W. Glycyrrhizin: An old weapon against a novel coronavirus // *Phytother Res.* Feb. Vol. 35(2). P. 629–636.
2. Venkatagopalan P., Daskalova S. M., Lopez L. A. et al. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly // *Virology.* 2015. Vol. 478. P. 75–85.
3. Schoeman D., Fielding B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge // *Virology Journal.* 2019. Vol. 16. P. 69.
4. Wilson L., Gage P., Ewart G. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication // *Virology.* 2006. Vol. 353(2). P. 294–306.
5. Gupta M. K., Vemula S., Donde R. et al. *In-silico* approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. Vol. 1–11.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (проект № МК-1580.2021.1.3).

## К ВОПРОСУ О БИОАКТИВНОСТИ ХИРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Е. В. Семенова, Е. В. Белова

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

✉ k.semenova99@gmail.com

### Аннотация

Хиральность играет важную роль в процессе разработки лекарственных средств, так как при попадании в человеческий организм противоположные энантиомеры хиральных лекарств проявляют различную биологическую активность. Проведена классификация 100 хиральных лекарств по биоактивности их энантиомеров. Выполнен расчет энергии связывания энантиомеров с мишенями лекарств для объяснения получившихся соотношений.

Лекарственные средства можно разделить на две группы: ахиральные (не имеющие в своей структуре хирального центра) и хиральные (имеющие в своей структуре по крайней мере один хиральный центр). Так, в 2008 году среди лекарств, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), 32 % составили ахиральные лекарственные препараты, а 68 % препаратов составили хиральные лекарственные средства, среди которых 63 % пришлось на энантиомерно чистые препараты и 5 % на рацематы [1]. Таким образом, больше половины одобренных в США в 2008 г. лекарств являются хиральными.

Хиральность играет важную роль в процессе разработки лекарственных средств, так как человеческий организм представляет собой хиральную среду, состоящую из таких хиральных структур, как белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Именно в хиральном окружении проявляются различные свойства энантиомеров [2]. Так, попадая в живой организм, один энантиомер препарата может проявлять терапевтический эффект, в то время как противоположный энантиомер может быть неактивным или менее активным, либо может обладать совершенно другим действием, как положительным, так и отрицательным для организма.

Примером лекарственного средства, демонстрирующим важность хиральности в фармакологии, является талидомид [3]. Данный препарат был синтезирован в 1954 г. и использовался как седативное и противорвотное средство для облегчения утренней тошноты на ранних сроках беременности. Однако позже стали появляться сообщения о таких врожденных дефектах у новорожденных, как фокемелия и амелия. Позже было установлено, что только R-талидомид обладает терапевтическим эффектом, в свою очередь S-энантиомер препарата является тератогенным для организма.

Ранее нами была проведена классификация сотни хиральных лекарственных средств по биоактивности их энантиомеров [4]. Так, на основе большого количества литературных источников была составлена подборка, включающая 100 хиральных лекарств, которая затем была разделена на пять групп: 1) препараты с биоактивным S-энантиомером, у которых R-энантиомер отвечает за побочные действия; 2) препараты с биоактивным S-энантиомером, у которых R-энантиомер является неактивным или менее активным; 3) препараты с биоактивным R-энантиомером, у которых S-энантиомер отвечает за побочные действия; 4) препараты с биоактивным R-энантиомером, у которых S-энантиомер является неактивным или менее активным и 5) препараты с двумя биоактивными энантиомерами.

В результате было установлено, что для большинства лекарственных средств подборки (55 препаратов из 100) биоактивным является S-энантиомер (препараты групп 1 и 2). Среди энантиомеров, вызывающих побочные действия чаще встречаются R-формы лекарств подборки (12 препаратов в группе 1 и 4 препарата в группе 3).

После проведенного исследования перед нами возник вопрос: как объяснить наблюдаемые соответствия между знаком хиральности энантиомеров препаратов и их биоактивностью? Известно, что большинство мишеней и ферментов метаболизма лекарств подборки являются белками, сформированными из «левых» аминокислотных остатков, которые образуют преимущественно правозакрученные  $\alpha$ -спирали, реже правозакрученные спирали  $3_{10}$  [5]. Возможно, знак хиральности мишени препарата или ферментов метаболизма влияет на знак хиральности биоактивного энантиомера. Этот вопрос остается открытым, так как в настоящий момент нет методов по оценке хиральности всей белковой глобулы, а, следовательно, нет возможности установить соответствие между хиральностью активного энантиомера и хиральностью белка, с которым взаимодействует лекарство.

Чтобы приблизиться к ответу на перечисленные выше вопросы, проведен расчет энергии связывания противоположных энантиомеров с мишенями лекарств с помощью метода молекулярного докинга.

---

В дальнейшем настоящая работа может быть использована как база для целей нанобиотехнологии, в первую очередь для более успешной разработки новых лекарственных средств.

#### **Литература**

1. Lin G.Q., Zhang J.G., Cheng J.F. Overview of Chirality and Chiral Drugs // Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action. 1st Edition. Hoboken: Wiley, 2011. P. 456.
2. Hancu G., Modroiu A. Chiral Switch: Between Therapeutical Benefit and Marketing Strategy // Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). 2022. V. 15(2). P. 240.
3. Franks M.E., Macpherson G.R., Figg W.D. Thalidomide // Lancet. 2004. V. 363(9423). P. 1802–1811.
4. Белова Е.В., Семенова Е.В., Твердислов В.А. О хиральности лекарственных препаратов и структур биомакромолекул // Биофизика. 2022. Т. 67(3). С. 477–491.
5. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell. 4th Edition. New York: Garland Science, 2002. P. 1462.

## ДЕЙСТВИЕ 17 $\beta$ -ЭСТРАДИОЛА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРЕДСЕРДИЙ КРЫС \*

Р. А. Симонова<sup>1</sup>, К. А. Бутова<sup>1</sup>, Т. А. Мячина<sup>1</sup>, А. М. Кочурова<sup>1</sup>,  
Г. В. Копылова<sup>1</sup>, Д. В. Щепкин<sup>1</sup>, А. Д. Хохлова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург

✉ raisa.simonova@mail.ru

### Аннотация

Исследовано прямое действие продукции 17 $\beta$ -эстрадиола на характеристики сокращения саркомеров и актин-миозинового взаимодействия в одиночных кардиомиоцитах предсердий и желудочков интактных самок крыс. Инкубация суспензии кардиомиоцитов с 17 $\beta$ -эстрадиолом привела к уменьшению амплитуды укорочений саркомеров и увеличению амплитуды  $[Ca^{2+}]_i$  в кардиомиоцитах желудочков, но не предсердий.

Эстрадиол — основной и наиболее биологически активный женский половой гормон, выполняет важную роль в регуляции сократительной функции желудочков [1]. Практически отсутствуют данные о влиянии эстрадиола на механическую функцию предсердий.

Цель работы — исследовать прямое влияние 17 $\beta$ -эстрадиола на сократительную функцию предсердий и желудочков на клеточном и молекулярном уровнях организации миокарда.

Эксперименты выполнены на самках крыс линии Wistar возрастом 23–24 недели в соответствии с Директивой 2010/63/EU и одобрены Этическим комитетом ИИФ УрО РАН. Одиночные кардиомиоциты предсердий и желудочков получали методом ретроградной перфузии сердца по Лангендорфу с модификациями [2]. Для анализа прямого действия 17 $\beta$ -эстрадиола на функциональные характеристики кардиомиоцитов и сократительных белков суспензия кардиомиоцитов инкубировалась с 10 нМ 17 $\beta$ -эстрадиола (Sigma-Aldrich, США) в растворе Тирод в течение 10 минут при температуре  $36 \pm 1$  °С.

Изменения концентрации цитозольного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) и динамику механически ненагруженных укорочений саркомеров регистрировали при помощи системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSM 710, Carl Zeiss, Германия) при частоте электрической стимуляции 1 Гц в течение 5 минут после инкубации. Для визуализации сигнала  $[Ca^{2+}]_i$  применялся  $Ca^{2+}$ -чувствительный флуорофор Fluo 8-AM (AAT Bioquest, Inc., США).

Для анализа актин-миозинового взаимодействия миозин выделяли из суспензии кардиомиоцитов после их инкубации. Далее измеряли скорость скольжения тонких филаментов, реконструированных из актина, тропонина и тропомиозина, по миозину в *in vitro* подвижной системе [3]. Степень фосфорилирования сократительных и регуляторных белков определяли в экстракте саркомерных белков, полученном из суспензии кардиомиоцитов, гель-электрофорезом с окрашиванием Pro-Q Diamond и SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, США) [3].

Выявлено, что 17 $\beta$ -эстрадиол уменьшает амплитуду укорочений саркомеров в кардиомиоцитах желудочков, но не предсердий. 17 $\beta$ -эстрадиол увеличивал амплитуду  $[Ca^{2+}]_i$  в кардиомиоцитах желудочков, но не влиял на неё в кардиомиоцитах предсердий.

Время достижения пика  $[Ca^{2+}]_i$  увеличилось в кардиомиоцитах предсердий, и не изменилось в миоцитах желудочков.

17 $\beta$ -эстрадиол увеличил скорость скольжения тонких филаментов по миозину предсердий и желудочков. После инкубации уменьшилась степень фосфорилирования тропомиозина, и увеличилась степень фосфорилирования регуляторной лёгкой цепи миозина в кардиомиоцитах предсердий. Обработка суспензии кардиомиоцитов желудочков привела к значительному уменьшению степени фосфорилирования сMyBP-C и TnT, что может частично объяснить уменьшение амплитуды сокращений саркомеров в кардиомиоцитах желудочков.

Таким образом, 17 $\beta$ -эстрадиол оказывает наибольшее действие на сократительную функцию кардиомиоцитов желудочков по сравнению с кардиомиоцитами предсердий. Уменьшение амплитуды сокращений кардиомиоцитов желудочков сопровождалось изменениями степени фосфорилирования и функциональных характеристик саркомерных белков.

\* Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН и поддержаны грантом РФФ № 22-75-10134.  
© Р. А. Симонова, К. А. Бутова, Т. А. Мячина, А. М. Кочурова, Г. В. Копылова, Д. В. Щепкин, А. Д. Хохлова, 2022

**Литература**

1. Bell J. R., Mellor K. M., Wollermann A. C. et al. Aromatase deficiency confers paradoxical postischemic cardioprotection // *Endocrinology*. 2011. V. 152. № 12. P. 4937–4947.
2. Butova X. A., Myachina T. A., Khokhlova A. D. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart // *MethodsX*. 2021.
3. Khokhlova A., Myachina T., Volzhaninov D. et al. Type 1 Diabetes Impairs Cardiomyocyte Contractility in the Left and Right Ventricular Free Walls but Preserves It in the Interventricular Septum // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. № 3. P. 1719.

## ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ПЕНИЦИЛЛАМИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ И ЕГО ВЛИЯНИЯ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ МОНОАМИНОКСИДАЗУ \*

А. В. Смолина<sup>1</sup>, Д. А. Полетаева<sup>1</sup>, Ю. В. Солдатова<sup>1</sup>, М. А. Савушкин<sup>2</sup>, Н. А. Санина<sup>1,3</sup>, И. И. Файнгольд<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

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

<sup>3</sup>НОЦ «Медицинская химия», Московский государственный областной университет, Черноголовка

✉ asmol@icp.ac.ru

### Аннотация

Перспективный NO-донор биядерный динитрозильный комплекс железа с пеницилламиновыми лигандами является эффективным антиоксидантом, проявляет выраженную антирадикальную активность, является ингибитором моноаминоксидазы А в экспериментах *in vitro*, что позволяет рекомендовать его для дальнейшей разработки лекарственного средства для терапии социально значимых заболеваний.

Биядерные сера-нитрозильные комплексы железа (СНКЖ) представляют собой синтетическую модель активных центров природных нитрозильных [2Fe-2S]-белков — резервуаров монооксида азота (NO), регулирующего различные биохимические и физиологические процессы в организме. Благодаря своей способности донорировать NO без дополнительной активации в физиологических условиях (в отличие от применяемых в клинике низкомолекулярных доноров NO) СНКЖ представляют значительный интерес в медицинской химии.

Мы исследовали биологическую активность биядерного динитрозильного комплекса железа с пеницилламиновыми лигандами  $[\text{Fe}_2(\text{S}(\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COOH}))_2(\text{NO})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (комплекс I), синтезированного в лаборатории структурной химии ИПХФ РАН. Известны антигипертензивные и противоишемические эффекты данного комплекса в опытах *in vivo* [1].

Многие патологические состояния прогрессируют, сопровождаясь развитием свободнорадикальных процессов окисления полиненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах, нарушениями работы мембраносвязанных ферментов и рецепторов. Фермент моноаминоксидаза А (MAO-A) является важным фактором стресс-индуцированного преждевременного старения кардиомиоцитов [2, 3]. Поэтому фармакологическое применение ингибиторов MAO не следует ограничивать неврологическими или нейродегенеративными заболеваниями, они имеют большой потенциал для лечения сердечной недостаточности пожилых людей. Известно, что NO участвует в регуляции ряда митохондриальных функций, в том числе работы мембраносвязанных ферментов.

Антиоксидантный потенциал комплекса I исследован спектрофотометрическим методом по изменению содержания ТБК-активного продукта (ТБК-АП) — малонового диальдегида — в гомогенате головного мозга мышей: комплекс эффективно ингибирует процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) ( $\text{IC}_{50} = 20,43 \pm 2,5$  мкМ). Изучено действие комплекса I, пеницилламинового лиганда, а также газообразного NO на кинетику процесса накопления ТБК-АП. Показано, что действие комплекса в основном обусловлено NO, выделяющимся при разложении комплекса. Методом хемилюминесценции мы исследовали антирадикальную активность комплекса I в гомогенате головного мозга мышей в присутствии трет-бутилгидропероксида в качестве инициатора ПОЛ. Комплекс I эффективно снижает количество свободных радикалов в опытных образцах ( $\text{IC}_{50} = 3,62 \pm 0,93$  мкМ).

Нами было изучено влияние исследуемого комплекса I на каталитическую активность фермента MAO изоформ А и В в гомогенате головного мозга мышей. Изоформы отличаются аминокислотной последовательностью и субстратной специфичностью, определяющей использование ингибиторов/активаторов MAO для лечения различных заболеваний. Комплекс I эффективно ингибирует работу MAO-A в диапазоне концентраций  $5 \cdot 10^{-5}$ – $10^{-3}$  М, в то время как пеницилламиновый лиганд не влияет на активность изофермента. Так как MAO-A участвует в процессах старения кардиомиоцитов, в том числе как важный источник АФК (в результате дегградации его основных субстратов норадреналина и серотонина образуется  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), а также в MAO-зависимом окислительном стрессе при различных возрастных патологиях, то исследуемый комплекс представляет интерес в качестве кардиопротектора, а также имеет потенциал для лечения депрессивных состояний, в том числе при нейродегенеративных расстройствах. При изучении действия комплекса I и пеницилламинового лиганда на активность MAO-B достоверных различий показателя между контролем и опытом не выявлено.

\* Изучение биологической активности комплекса I поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 22-24-00764). Синтез исследуемого комплекса поддержан Государственным заданием [№ АААА-А19-119071890015-6].

© А. В. Смолина, Д. А. Полетаева, Ю. В. Солдатова, М. А. Савушкин, Н. А. Санина, И. И. Файнгольд, 2022

**Литература**

1. Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С. и др. Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа катионного типа в качестве вазодилаторного лекарственного средства // Патент РФ № 2460531–2012.
2. Manzella N., Santin Y., Maggiorani D. et al. Monoamine oxidase-A is a novel driver of stress-induced premature senescence through inhibition of parkin-mediated mitophagy // *Aging Cell*. 2018. V. 17(5). P. e12811.
3. Iacovino L.G., Manzella N., Resta J. et al. Rational redesign of monoamine oxidase A into a dehydrogenase to probe ROS in cardiac aging // *ACS Chem. Biol.* 2020, V. 15(7). P. 1795–1800.

## К ВОПРОСУ О СЕГМЕНТАЦИИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

А. Т. Суюндукова<sup>1</sup>, Е. П. Вахрушева<sup>1</sup>, В. П. Демкин<sup>1</sup>, С. В. Мельничук<sup>1</sup>, К. В. Завадовский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный университет

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии Томского НИМЦ

E-mail: almagul.suyundukova@mail.ru, lizastepanova52@gmail.com,  
osbereg@yandex.ru, demkin@ido.tsu.ru, konstzav@gmail.com

### Аннотация

Целью данной работы является повышение качества геометрической модели коронарных артерий при выполнении процесса полуавтоматической сегментации по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) с использованием программного обеспечения 3D Slicer.

Стенозирующий атеросклероз коронарных артерий как ведущая причина развития ишемической болезни сердца (ИБС) значительно изменяет гемодинамику кровотока на стенозированных участках коронарных артерий и негативно сказывается на реологических характеристиках крови.

В случае промежуточного стеноза, при котором уменьшение просвета артерии находится в диапазоне от 40 до 70 %, определяется фракционный резерв кровотока (FFR). В норме данный показатель равен 1; значение  $FFR < 0,8$  указывает на ишемию, при лечении которой применяют инвазивные методы [1].

В настоящее время медицинское диагностическое оборудование позволяет проводить прямые измерения кровотока *in vivo*, однако подобные инвазивные методы часто сопряжены с риском нарушения целостности сосудистой системы, и их применение ограничено требованиями безопасности. В этих случаях альтернативой инвазивным методам является использование методов математического моделирования.

Ранее в работах [2–3] нами было показано, что задача неинвазивного определения FFR предполагает построение гемодинамической модели коронарного дерева и расчета параметров кровотока с помощью уравнений Навье–Стокса и уравнения непрерывности в стационарном приближении, представляющими собой систему дифференциальных уравнений второго порядка в частных производных для вязкой несжимаемой жидкости.

Однако численная модель гемодинамики невозможна без правильно построенной трёхмерной геометрии сосудов. Основной особенностью воссоздания 3D-модели геометрии сосудов является: процесс сегментации с удалением кальциатов и учетом артефактов, наличие которых препятствует правильной оценке FFR.

В данном исследовании осуществлялась полуавтоматическая сегментация постконтрастных DICOM-изображений, полученных с помощью мультиспиральной компьютерной томографии. Сегментация выполнялась с использованием открытого программного обеспечения 3D Slicer с применением метода порогового отсечения значений и ручной корректировки оператором. На каждом срезе выделялись зоны интереса: красным — аорта, желтым — правая коронарная артерия, зеленым — левая коронарная артерия, помимо этого моделировался участок со стенозом и коронарным стентом. Далее, после сегментации всех срезов, выделенные области интереса соединялись между собой, в результате чего получилась цифровая 3D-модель в формате STL. Полученные 3D-модели сравнивались с 3D-изображениями со станции НИИ кардиологии Томского НИМЦ.

В результате данного исследования определены факторы, влияющие на качество 3D-модели и условия для чтения STL-файла прикладными программными пакетами, для дальнейшего расчета FFR.

### Литература

1. Tonino P.A., De Bruyne B., Pijls N.H. et. al. Fractional flow reserve versus angiography for guiding percutaneous coronary intervention. // *New Engl. J. Med.* — 2009. — Vol. 360 — № 3. — P. 213–224.
2. Суюндукова А.Т., Мельничук С.В., Демкин В.П., Завадовский К.В. Определение фракционного резерва кровотока в коронарных сосудах методом локальной гемодинамики // VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2020: сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2020. — С. 267–269.
3. Демкин В.П., Мельничук С.В., Завадовский К.В. и др. Влияние динамической вязкости крови на коронарный кровоток стенозированного участка артерии // *Изв. вузов. Физика.* — 2021. — Т. 64. — № 12. — С. 172–178.



## ОЦЕНКА ФРАКЦИОННОГО РЕЗЕРВА КРОВОТОКА МЕТОДОМ ЛОКАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ В БИФУРКАЦИЯХ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

А. Т. Суюндукова<sup>1</sup>, В. П. Демкин<sup>1</sup>, С. В. Мельничук<sup>1</sup>, К. В. Завадовский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный университет

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии Томского НИМЦ

E-mail: [almagul.suyundukova@mail.ru](mailto:almagul.suyundukova@mail.ru), [demkin@ido.tsu.ru](mailto:demkin@ido.tsu.ru),  
[osbereg@yandex.ru](mailto:osbereg@yandex.ru), [konstzav@gmail.com](mailto:konstzav@gmail.com)

### Аннотация

В данной работе рассматривается применение метода локальной гемодинамики для оценки фракционного резерва кровотока в бифуркациях коронарных артерий (КА) в случаях последовательного (тандемного) стеноза эпикардиальной артерии без поражения ее боковых ветвей и параллельного стеноза коронарной артерии в области бифуркации.

По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной смертности населения в мире. Лидирующее место среди ССЗ занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС), которая представляет собой острую или хроническую дисфункцию сердца и обусловлена атеросклерозом КА, который ограничивает кровоток к сердечной мышце и может привести к тяжелым последствиям (инфаркт миокарда, острая сердечная недостаточность и т. д.) [1].

Одним из современных методов оценки ишемии миокарда является определение фракционного резерва кровотока (ФРК) по данным компьютерной томографической коронарографии (КТКАГ). Данный метод демонстрирует высокую информативность и позволяет с высокой точностью идентифицировать гемодинамически значимые стенозы [2]. При этом в клинической практике данный метод используется недостаточно широко в связи с высокой стоимостью и тем фактом, что такой анализ КТКАГ проводит только фирма HeartFlow Inc. В связи с этим разработка альтернативных решений для оценки ФРК, которые пригодны для широкого использования в целях своевременного выявления значимых сужений коронарных артерий по данным КТКАГ, является актуальной междисциплинарной задачей.

В клинической практике нередко встречаются тандемные, бифуркационные и диффузные стенозы, которые еще недостаточно изучены. Состояние КА и кровоснабжение миокарда у пациентов с данными типами стеноза характеризуется разнообразием и тяжестью поражения, что требует тщательного подхода к определению показаний к операции.

Например, в случае тандемного стеноза, который представляет собой наличие двух последовательных поражений разделенные между собой сегментом неизменной коронарной артерии, ФРК рассчитывается как отношение среднедистального внутрисосудистого давления в коронарной артерии к среднему давлению. Однако правильным было бы учитывать при оценке ФРК коллатеральное давление, которое вносит вклад в общий кровоток.

В работе [3] нами был представлен метод локальной коронарной гемодинамики для вычисления ФРК в случае одиночного стеноза. В данном исследовании проведено моделирование нескольких случаев атеросклеротического поражения коронарной артерии: последовательного (тандемного) и бифуркационного стеноза II типа сферической формы.

Вычислительный эксперимент показал, что результаты расчетов ФРК, основанные на локальной математической модели кровотока в КА, хорошо согласуются с результатами клинических исследований.

### 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.
2. Doukas D., Allen S., Wozniak A. et al. Relationship of Stress Test Findings to Anatomic or Functional Extent of Coronary Artery Disease Assessed by Coronary Computed Tomography Angiography-Derived Fractional Flow Reserve // Biomed. Res. Int. 2021. V. 2021. P. 6674144.
3. Демкин В.П., Мельничук С.В., Завадовский К.В. и др. Влияние динамической вязкости крови на коронарный кровоток стенозированного участка артерии // Изв. вузов. Физика. 2021. Т. 64. № 12. С. 172–178.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОДИНАМИКИ СВЯЗЫВАНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ ВИРУСА ГРИППА С АНАЛОГОМ РЕЦЕПТОРА КОМПЬЮТЕРНЫМИ МЕТОДАМИ

В. В. Унгурия<sup>1,2</sup>, А. Ю. Бакулина<sup>2</sup>, Н. П. Колосова<sup>1</sup>, А. В. Даниленко<sup>1</sup>, А. Б. Рыжиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ v.unguryan@g.nsu.ru

### Аннотация

Гемагглютинин вируса гриппа — мембранный поверхностный белок, играющий ключевую роль в процессе проникновения вируса внутрь клетки. Посредством данного белка вирус связывается с рецептором на поверхности клеточной мембраны — олигосахаридом, терминированным остатком сиаловой кислоты. В результате связывания запускается механизм эндоцитоза. Энергетические характеристики связывания белка с рецептором определяют вероятность проникновения вируса в клетку.

В последние годы в мире широко распространилась новая группа вирусов гриппа, относящаяся к серотипу А(Н3N2). Она получила название группы вирусов Бангладеш и практически вытеснила представителей других групп данного серотипа. Целью работы было оценить возможную роль структурных особенностей гемагглютинина представителя группы Бангладеш в сравнении с гемагглютинином международного вакцинного штамма серотипа А(Н3N2).

В работе исследовались гемагглютинины представителя группы Бангладеш и международного вакцинного штамма в комплексе с 6'-sialyl-N-acetylactosamine — аналогом человеческого рецептора. Структуры исследуемых комплексов экспериментально не установлены, поэтому начальные конфигурации комплексов были получены методом сравнительного моделирования в программе MODELLER с использованием шаблона белка с высоким процентом идентичности последовательности — 95 % (код PDB — 6bkt). В ходе анализа модельных структур было обнаружено пять аминокислотных замен в сайте связывания, из которых три положения находятся в контакте с аналогом рецептора и могут давать значимый вклад в разницу аффинностей.

Для учёта эффекта кооперативных движений аминокислотных остатков и аналога рецептора были записаны молекулярно-динамические траектории комплексов в программе NAMD с параметризацией белков и аналога рецептора с помощью полей сил AMBER и GLYCAM соответственно, в течение 100 наносекунд. Для референсного белка у аналога рецептора было обнаружено два конформера, отличающиеся друг от друга по среднеквадратичному отклонению тяжёлых атомов на 2 Å с приоритетной конформацией, соответствующей структуре шаблона. Для представителя группы Бангладеш конформация аналога рецептора оставалась стабильной на протяжении всего времени моделирования. Различие может быть связано с тем, что аналог рецептора в комплексе с гемагглютинином группы Бангладеш сильнее взаимодействует с расположенной в сайте связывания альфа-спиралью, в которой как раз и присутствуют замены в сравнении с референсным белком.

В дальнейшем с помощью программы для молекулярного докинга Autodock 4 оценивалась свободная энергия связывания белков с аналогом рецептора. Для этого были выбраны наиболее репрезентативные конфигурации комплексов из молекулярно-динамической траектории с использованием метода главных компонент. Молекулярный докинг выполнялся с явным учётом первой гидратной оболочки воды вокруг гибкого аналога рецептора. Для обоих комплексов Autodock 4 предсказывал корректную конформацию связывания. Для комплекса с представителем Бангладеш предсказанная оценка оказывается ниже, что может объяснять более высокую трансмиссивность новой группы вирусов. Оценка влияния отдельных замен на результаты может дать информацию о роли каждой замены в изменении аффинности. Структурные особенности гемагглютининов новой, более трансмиссивной группы вирусов могут оказаться важны для создания лекарств.

## ТЕРМИЧЕСКАЯ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ ПРИ ПРОБОПОДГОТОВКЕ

М. В. Фоменко

*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск  
Новосибирский государственный университет*

✉ m.fomenko@g.nsu.com

### Аннотация

Важной проблемой количественной метаболомики является деградация соединений в образце из биологической ткани в процессе пробоподготовки. Изменения происходят в связи с термическим распадом молекул и ферментативными реакциями. Таким образом, для проведения исследований, основанных на данных о концентрациях метаболитов в различных тканях, необходимо знать, насколько устойчивы эти соединения к условиям проводимой пробоподготовки, и учитывать эту информацию в полученных результатах.

Исследование проводилось с двумя типами тканей: человеческой кровью и крысиным мозгом. Чтобы установить влияние термических и ферментативных реакций, было проведено два типа экспериментов. В первом метаболиты, экстрагированные из мозга и крови, хранились при +4°C в течение суток, при этом активность ферментов тушилась метанолом на этапе гомогенизации. Во втором типе экспериментов водные гомогенаты крови и мозга хранились в течение суток при +4°C. Аликвоты экстрактов и гомогенатов забирались через 0, 0,5, 1, 2, 3, 5 и 24 часа и проводился их метаболомный анализ. По итогам анализа концентраций метаболитов в тканях, полученных методом <sup>1</sup>H ЯМР, установлено, что после остановки ферментативных процессов как для крови, так и для мозга, метаболомный состав образцов оставался постоянным в течение суток. При хранении гомогенатов тканей в связи с непрекращённой активностью ферментов в первую очередь деградации подверглись метаболиты, принимающие участие в генерации клеточной энергии, такие как АТФ, АДФ, НАДН и НАД. НАДН и НАД практически полностью распались уже в процессе гомогенизации. Также изменения в концентрациях наблюдались практически для всех групп соединений: аминокислот, сахаров, органических кислот, нуклеотидов, нуклеозидов. Характерные времена изменения концентраций одних и тех же соединений значительно различаются между кровью и мозгом. Также для некоторых соединений различаются цепочки превращений. Для мозга характерна более глубокая степень деградации метаболитов, чем для крови. Учитывая полученные результаты, мозг обладает заметно более высоким уровнем ферментативной активности, чем кровь.

Основываясь на полученных результатах, можно заключить, что для получения корректных метаболомных данных необходимо тушить ферментативную активность на самой начальной стадии пробоподготовки. Также необходимо брать в расчёт тип используемой ткани и предполагаемую ферментативную активность. Чем она ниже, тем мягче требования к температуре и времени пробоподготовки.

## ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО ДАВЛЕНИЯ И СТАРЕНИЯ НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОДЕРЖАНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ В ЗЕРНОВКАХ ПШЕНИЦЫ

Я. И. Храмова, Е. Э. Нефедьева, В. Н. Храмова

*Волгоградский государственный технический университет*

✉ nefedieva@rambler.ru

### Аннотация

Зерновки пшеницы мягкой сорта Саратовская 73 обрабатывали импульсным давлением (ИД) и хранили три года. Содержание антиоксидантов (АО) в контрольных мучнистых зерновках было выше, чем в стекловидных, а содержание продуктов ПОЛ — ниже. При обработке ИД у стекловидных зерновок содержание АО возросло, у мучнистых — не изменилось относительно контроля. ПОЛ в зерновках, обработанных ИД 11 МПа, было ниже контроля. Повышение ПОЛ при ИД 29 МПа свидетельствует о накоплении повреждений.

Продолжительное хранение семян приводит к снижению активности антиоксидантной системы и повышению концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). По интенсивности ПОЛ в семенах можно оценить адаптационные возможности организма, а по антиоксидантной системе — его компенсаторный потенциал. Эти показатели взаимосвязаны и взаимозависимы [1]. Стрессовые воздействия могут быть инициаторами ПОЛ.

Семена пшеницы яровой мягкой сорта Саратовская 73 обрабатывали импульсным давлением (ИД), создаваемым ударной волной, 11 МПа и 29 МПа [2]. Через три года после обработки и хранения зерновки были отсортированы на диафаноскопе на стекловидные (партия С) и мучнистые (партия М). Содержание антиоксидантов (АО) определяли о-фенантролиновым методом [3], продукты ПОЛ — по реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой [1].

Содержание АО (см. рисунок, А) в контрольных зерновках с мучнистым эндоспермом было выше, чем в контрольных стекловидных зерновках, что связано с проявлением специфичности в корреляции компонентов АОС.

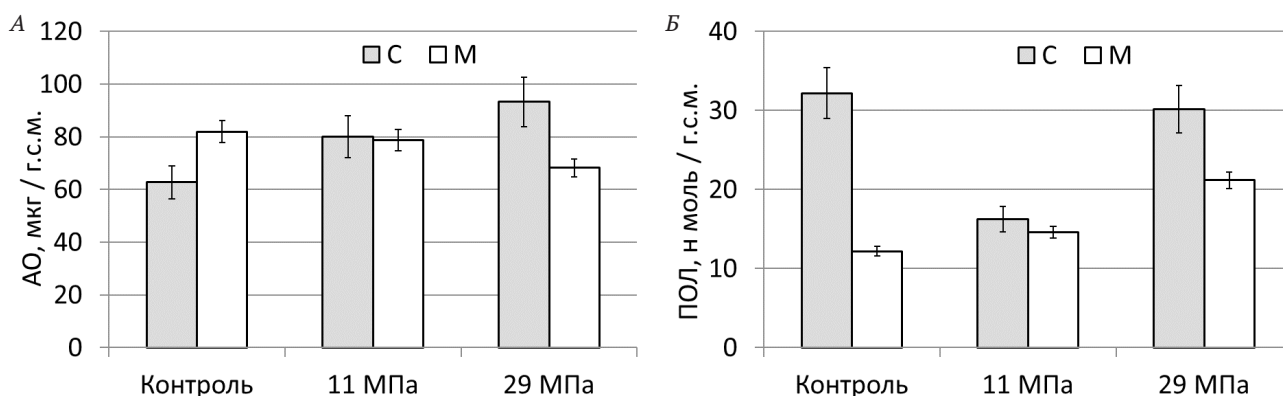
При обработке ИД 11 МПа у стекловидных зерновок (С) содержание АО значительно возросло по сравнению с контролем. Это может указывать на повреждения структуры эндосперма и высвобождение соединений с антиоксидантной активностью.

В зерновках с мучнистым эндоспермом (М), обработанных ИД 11 МПа, содержание АО не изменилось по сравнению с контролем. Обработка ИД 11 МПа продляет жизнь семян, ингибируя окислительные реакции [1].

После обработки ИД 29 МПа у стекловидных зерновок также возросло содержание АО, а на мучнистые семена обработка не оказала подобного воздействия.

Следовательно, для партий мягкого сорта пшеницы, в которых преобладают мучнистые зерновки, обработка ИД может быть применена как метод продления состояния покоя.

Как видно на рисунке Б, в контрольных зерновках со стекловидным эндоспермом партии С по сравнению с партией М содержание продуктов ПОЛ высокое, возможно, стекловидные зерновки мягкой пшеницы потеряли жизнеспособность при хранении. Об этом свидетельствуют наши исследования всхожести семян [4]. Содержа-



Содержание антиоксидантов (А) и продуктов ПОЛ (Б) в зерновках

ние продуктов ПОЛ в зерновках, обработанных ИД 11 МПа, было существенно ниже контроля. Это указывает на работу антиоксидантной системы, связывающей свободные радикалы. Повышение ПОЛ при ИД 29 МПа свидетельствует о некоторой избыточности действующего фактора для данного типа семян, в них накапливаются и развиваются микроповреждения.

Таким образом, обработка ИД 11 МПа продляет жизнь семян мягкой пшеницы за счет снижения содержания скорости накопления продуктов ПОЛ.

### Литература

1. Верховуров В. В. Физиолого-биохимические процессы в зерновках ячменя и пшеницы при их хранении, прорастании и переработке: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2008. 44 с.
2. Пат. 2083073 Российская Федерация, МПК А01С 1/00, А01G 7/04 Способ предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур / Атрощенко Э.С. и др. 10.07.1997.
3. Темердашев З. А. Определение антиоксидантной активности ряда пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III)/Fe(II) — органический реагент / З. А. Темердашев, Н. В. Храпко, Т. Г. Цюпко и др. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2006. Т. 72(11). С. 15-19.
4. Нефедьева Е.Э., Храмова Я.И., Храмова В.Н. и др. Dependence of germination of wheat grains after the treatment by impulse pressure and long-term storage on the vitreousness of endosperm // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Vol. 677. IV International Scientific Conference: AGRITECH-IV-2020: Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies (Krasnoyarsk, Russian Federation, 18-20 November 2020). IOP Publishing, 2021. 7 p.

## НОВЫЙ АНТИБИОТИК АУРАПЛАНИН ВЛИЯЕТ НА ТЕРМОДИНАМИКУ А-САЙТОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЕ

Д. Д. Чайка<sup>1</sup>, О. А. Толичева<sup>1</sup>, А. Л. Коневега<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики

им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

✉ adam.loop.0690@gmail.com

### Аннотация

Из-за повсеместно повышающейся резистентности бактерий к антибиотикам всё более актуальной задачей становится поиск и разработка новых антибактериальных препаратов [1]. Данная работа посвящена исследованию влияния антибиотика аурапланина на парциальные реакции цикла элонгации в бактериальной рибосоме.

На сегодняшний день около половины всех известных антибактериальных препаратов действуют как ингибиторы синтеза белка — их мишенью является бактериальная рибосома [2, 3]. Было обнаружено, что культуральная жидкость штамма *Actinoplanes sp. 49252* содержит вещество, ингибирующее рост бактериальных культур путем воздействия на их систему биосинтеза белка [4]. При этом активное соединение, получившее название аурапланин, не принадлежит ни к одному из известных классов антибиотиков.

С помощью реконструированной *in vitro* системы синтеза белка из *E. coli* было определено влияние аурапланина на кинетические и термодинамические параметры А-сайтового взаимодействия. Полученные данные показали, что аурапланин ускоряет диссоциацию А-сайтовой пептидил-тРНК, увеличивая константу диссоциации  $K_d$  и наблюдаемую скорость диссоциации пептидил-тРНК из А-сайта рибосомы. Из построения Вант-Гоффа мы определили изменение энтальпии  $\Delta H^0$  и энтропии  $\Delta S^0$  реакции в присутствии и в отсутствие аурапланина. Стабильность тРНК в рибосоме обеспечивается двумя видами взаимодействий: взаимодействием между тРНК и мРНК в кодон-антикодонном дуэлексе, вносящим основной вклад, и взаимодействием тРНК с большой субъединицей рибосомы. Поскольку добавление аурапланина уменьшает абсолютное значение  $\Delta H^0$  реакции по сравнению с контрольным экспериментом ( $|\Delta H^0_{\text{Аур}}| < |\Delta H^0_{\text{контроль}}|$ ), можно утверждать, что вклад кодон-антикодонного взаимодействия в энергетику связывания дипептидил-тРНК в А-сайт уменьшился. С точки зрения энтропии образование кодон-антикодонного взаимодействия вне зависимости от присутствия антибиотика невыгодно. Однако связанное состояние становится ещё более невыгодным при внесении аурапланина.

Престационарная кинетика связывания аминоксил-тРНК в А-сайте и престационарная кинетика транслокации рибосомы исследовались с помощью метода остановленного потока. Согласно полученным данным, в присутствии аурапланина наблюдается замедление скорости связывания тРНК в А-сайте, а также увеличение скорости транслокации пептидил-тРНК из А-сайта в Р-сайт. Для оценки влияния аурапланина на образование пептидной связи проводили *in vitro* трансляцию с последующим выделением синтезированных дипептидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный антибиотик не влияет на образование первой пептидной связи.

### Литература

1. Ventola C. Lee. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats // P & T: a peer-reviewed journal for formulary management. 2015. Vol. 40(4). P. 277–283.
2. Arenz S., Wilson D.N. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition // Cold spring harbor perspectives in medicine. 2016. Т. 6. № 9. С. a025361.
3. Vázquez-Laslop N., Mankin A. S. Context-specific action of ribosomal antibiotics // Annual review of microbiology. 2018. Т. 72. С. 185–207.
4. Лисевич И.М., Лукьянов Д.А., Остерман И.А. и др. Расшифровка механизма действия нового потенциального ингибитора бактериальной трансляции, выделенного из штамма *Actinoplanes sp. 49252* // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. — 2020. — Т. 2 (электронный). Тез. докл. молодежной конф., состав участников Школы. С. 142–143.

## МЕХАНОПОРАЦИЯ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ СТ26 НА ПОВЕРХНОСТИ МАССИВА ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НИТЕВИДНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ, А ТАКЖЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВАЦИИ КЛЕТОК НА ИХ ПОВЕРХНОСТИ

С. В. Шмаков<sup>1</sup>, В. А. Полежаева<sup>1</sup>, В. М. Кондратьев<sup>1</sup>, В. М. Бойцов<sup>1</sup>, А. Д. Большаков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский академический университет им. Ж. И. Алфёрова

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт

✉ natdobryak@gmail.com

### Аннотация

В работе продемонстрирована возможность трансфекции клеток с помощью массива нитевидных нанокристаллов (ННК) — вертикальных игл, сформированных методом молекулярно-пучковой эпитаксии на основе GaP/GaPAs. Показаны особенности культивации клеточной культуры СТ26 на поверхности ННК.

Трансфекция — доставка генетического материала к клеткам-мишеням — является одной из важнейших задач современной биологии и биотехнологии: по запросу «Cell transfection» поисковая система Google scholar индексирует более 23 тысяч статей только за 2021 год. Все методы доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени можно разделить на три категории: физические, химические и методы, основанные на использовании вирусов; каждая из этих категорий имеет свои сильные и слабые стороны, которые определяют области их применения. Так, физические методы обладают достаточно высокой эффективностью и универсальностью, не требуют постоянных закупок реактивов, однако обладают высокой токсичностью и плохо поддаются масштабированию. В работе представлено исследование возможности применения нового физического метода трансфекции — механопорации — трансфекции с помощью массива наноразмерных игл, обратимо нарушающих целостность мембраны культивируемых на них клеток.

В работе представлены результаты исследования особенностей культивации клеточной культуры аденокарциномы толстой кишки мыши, стабильно экспрессирующей белок EGFP, на поверхности массива ННК. ННК были сформированы на основе GaP/GaPAs на подложке из монокристаллического кремния, длина составила ~ 5 мкм. Методом конфокальной микроскопии установлено, что жизнеспособность клеток не нарушается в течение 96 часов, на пятые сутки клетки погибают. Методами конфокальной (рис. 1) и сканирующей электронной микроскопии (рис. 2) показана способность клеток к механической деформации и разрушению ННК с последующим эндоцитозом и накоплением во внутриклеточном пространстве. Показано увеличение проницаемости мембраны клеток для малых молекул на примере DAPI. Демонстрируется возможность трансфекции клеток СТ26 (не несущих ген EGFP) методом механопорации при культивации на поверхности массива ННК путем простого добавления плазмиды, несущей ген GFP, в культуральную среду (рис. 3).

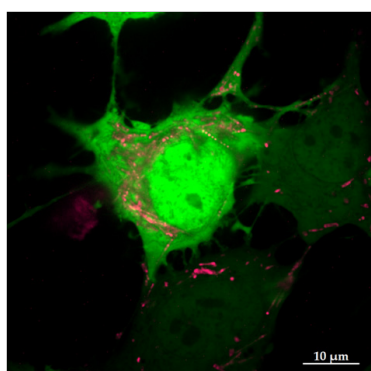


Рис. 1. Накопление полупроводниковых ННК (красная флуоресценция) в клетке СТ26 EGFP (зеленая флуоресценция) через 96 часов культивации



Рис. 2. Клетка СТ26 EGFP на поверхности массива ННК. На вставке демонстрируется момент разрушения ННК клеткой

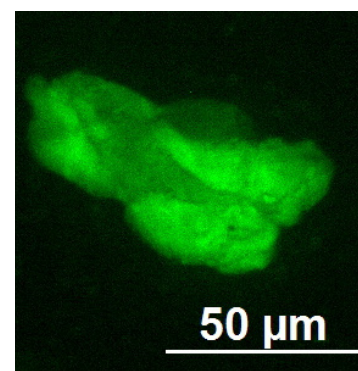


Рис. 3. Клетки СТ26, трансфицированные плазмидой, несущей ген GFP, методом механопорации

## ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИЙ ТОРМОЗНОГО НЕЙРОМЕДИАТОРА ГАМК В ОТВЕТ НА КОРОТКИЙ ЗРИТЕЛЬНЫЙ СТИМУЛ, ИЗМЕРЕННЫЕ ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОННОЙ МРС

А. Н. Яковлев<sup>1-3</sup>, А. В. Грицкова<sup>4</sup>, М. В. Ублинский<sup>1,2</sup>, А. В. Манжурцев<sup>1,2,4</sup>, Т. А. Ахадов<sup>1,4</sup>, Н. А. Семенова<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, Москва

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова, Москва

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля, Москва

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

✉ yakovlevalekcej@bk.ru

### Аннотация

Глутамат (Glu) и  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК) являются основными нейромедиаторами (возбуждающим и тормозным, соответственно). В исследованиях с использованием единичного стимула изменение Glu в коротком периоде времени связано с выпуском нейромедиатора из везикул, так как метаболические процессы имеют недостаточную скорость. Косвенным подтверждением является быстрое заполнение везикул нейромедиатором: характерное время процесса от 1 до 20 с. В работах с использованием длительного стимула (от 30 с) изменения в основном связывают с метаболизмом. К настоящему времени известно, что средний уровень ГАМК в ответ на стимуляцию снижается. Поскольку ГАМК также является нейромедиатором и упакован в везикулы, при вовлечении тормозных процессов в обработку зрительного стимула, ожидается увеличение интенсивности ЯМР сигнала ГАМК в коротком периоде. Последующая кинетика будет характеризовать возвращение ГАМК в везикулы.

Цель данной работы при помощи 1H-МРС измерить динамику основных нейромедиаторов в ответ на короткий зрительный стимул. МРТ и протонная МРС выполнены на 3T-томографе Philips Achieva dStream. В исследовании приняли участие 33 и 25 здоровых волонтера для измерения GABA и Glu, соответственно. Для зрительной активации использовалась мерцающая с частотой 8 Гц шахматная доска в блоках (3 с - стимуляция, 13,5 / 21 с — черный экран (GABA/Glx); 15 раз для фМРТ и 40 — МРС). ФМРТ-изображения получены при помощи GE EPI со следующими параметрами TR/TE = 3000/40 мс, угол отклонения = 90°, разрешение = 2,4×2,4 мм, толщина среза = 4 мм, число срезов = 30 (83 накопления). Спектры для измерения GABA получены при помощи импульсной последовательности MEGA-PRESS (TR/TE = 1500/68мс, NSA = 802, 30×40×25 мм), для Glx — PRESS (TR/TE = 2000/35мс, NSA = 432, 20×30×20 мм) и локализованы в активированной области зрительной коры. Ширина линии и высота сигналов метаболитов определена из аппроксимации резонансных линий Cr (3 м.д.) и NAA (2 м.д.). Количественная обработка спектров выполнена при помощи LCmodel.

Апостериорный тест Даннета выявил статистически значимые изменения ширины линии и высот резонансных линий Cr и NAA. Ширины линий этих метаболитов уменьшаются, а высоты — увеличиваются, причем максимальное изменение наблюдается на 6-й секунде. Статистически значимых изменений уровней ГАМК не выявлено. Наблюдается статистически значимое увеличение Glx (Glu+Gln) на 1-й и 15-й секундах после начала предъявления стимуляции.

Наше исследование демонстрирует применимость протонной МРС для измерения BOLD-ответа, в том числе и его временных характеристик, в группе испытуемых. Данное изменение показывает преимущество использования МРС в сопоставлении нейронной активности (при помощи BOLD-эффекта) и метаболических уровней.



## РАЗДЕЛ IV

## ВИРУСОЛОГИЯ

## ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К КОНСЕРВАТИВНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ГРИППА А ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНОЙ

Е. Д. Авдонина, Э. А. Артемова, Е. С. Седова, М. М. Шмаров

*Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва*

✉ avdonina.yelena@mail.ru

**Аннотация**

В настоящей работе оценивался защитный эффект ненейтрализующих антител, которые вырабатываются в ответ на введение векторной вакцины на основе аденовируса человека 5-го серотипа. Он экспрессирует гены консервативных антигенов вируса гриппа А нуклеопротеина и ионного канала, содержащих консенсусные для человека, свиней и птиц В- и Т-клеточные эпитопы.

Существующие вакцины против вируса гриппа защищают от штаммов, циркулирующих в конкретный эпидемический сезон, поэтому пересмотр штаммового состава современных вакцин требуется каждые 1–2 года.

В связи с этим растет актуальность исследований, направленных на получение универсальных вакцин на основе консервативных антигенов. Они не индуцируют выработку вирус-нейтрализующих антител, но оказывают протективный эффект [1]. Примерами таких антигенов служат консервативные белки вируса гриппа А: нуклеопротеин (NP) и ионный канал (M2).

Ранее нами была создана кандидатная вакцина на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа (Ad5), который экспрессирует гены консервативных антигенов вируса гриппа А NP и M2, содержащих консенсусные для человека, свиней и птиц В- и Т-клеточные эпитопы.

Вакцина Ad5-M2NP показала индукцию как гуморального, так и клеточного специфического иммунного ответа к целевым антигенам, а также хороший уровень защиты от различных субтипов вируса гриппа А [2].

В данной работе мы оценивали защитный эффект антител, которые вырабатываются в ответ на введение вакцины. Для устранения вклада клеточного звена в защиту, лабораторным животным осуществляли перенос только сывороток, содержащих антитела.

**Дизайн**

Самок мышей BALB/c со средним весом 18 г разделили на четыре группы: первая — вакцинированные, вторая — «доноры», третья — «реципиенты», четвертая — контроль (рис. 1).

Группы 1 и 2 иммунизировали интраназально векторной вакциной Ad5-M2NP, в дозе  $10^8$  БОЕ/мышь по 50 мкл; группе 4 ввели физиологический раствор. Через 28 дней у группы 2 («доноров») отобрали сыворотку и перенесли ее группе 3 — наивным «реципиентам» (–1-е сутки) внутрибрюшинно по 200 мкл. На следующий день (0-е сутки) группы 1, 3 и 4 заражали  $2LD_{50}$  вируса гриппа А/H2N3. Перенос сыворотки повторяли на 4-е сутки после заражения. В течение 14 дней после заражения оценивали выживаемость всех групп мышей.

Через 24 часа после каждого переноса сыворотки определяли уровень антител к вирусу гриппа А у мышей группы 3.

Титр антител определен непрямой иммуноферментным анализом (ИФА). В качестве антигена брали очищенный вирус гриппа А/H2N3/BlackDuck/New Jersey/1580 в сорбционной дозе 5 мкг/мл; исследовали сыворотки, отобранные спустя 24 часа после каждого переноса; конъюгат — козы антимышинные моноклональные антитела, меченые пероксидазой хрена.

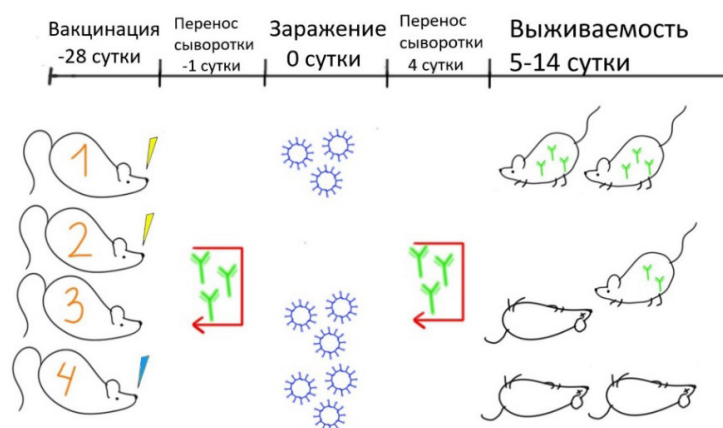


Рис. 1. На мышах указан номер группы, сверху отложен временной промежуток. Вакцинация Ad5-M2NP показана желтой стрелкой, введение физиологического раствора — синей.

У группы 2 после вакцинации *среднегеометрический титр (СГТ)* антител к вирусу гриппа А составил 6 400. У группы 3 СГТ антител составил: 24 часа после переноса — 720; 24 часа после второго переноса — 1 200.

ИФА показал, что после вакцинации у «доноров» выработались антитела к вирусу гриппа А, которые успешно были перенесены «реципиентам».

#### Процент выживаемости

Положительным контролем в эксперименте служили вакцинированные мыши, выживаемость которых составила 100 %. Отсутствие гибели в группе обусловлено участием клеточного звена иммунитета. У мышей, получавших в качестве защиты только сыворотку с антителами, выживаемость была на уровне 64 % (рис. 2).

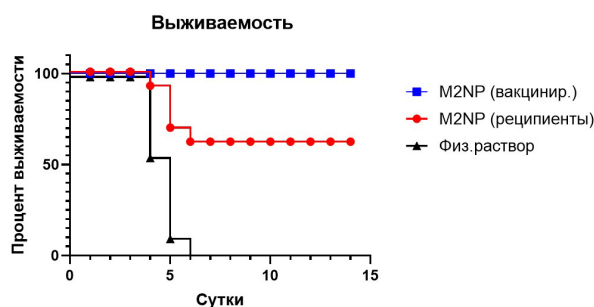


Рис. 2. Процент выживаемости группы 1 (синяя линия), группы 3 (красная линия) и группы 4 (черная линия)

Результаты показали, что вакцина на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, который экспрессирует гены консервативных антигенов вируса гриппа А NP и M2, содержащих консенсусные для человека, свиней и птиц B- и T-клеточные эпитопы, обладает протективным действием. Вырабатываемые антитела хоть и не обладают вирус-нейтрализующей активностью, но защищают от гибели животных на 64 %.

#### Литература

1. Седова Е. С. и др. Нейтрализующие антитела к консервативным антигенам вируса гриппа // Acta Naturae. 2019. Vol. 11, N 4(43). P. 22–32.
2. Tutykhina I. et al. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts // PLoS One. 2018, Jan 29; Vol. 13(1).

## ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ $\beta$ -АМИЛОИДОВ ПРИ ТРАНСМИССИВНЫХ СПОНГИОФОРМНЫХ АМИЛОИДОЗАХ

А. Н. Асташонок<sup>1</sup>, С. А. Гузов<sup>2</sup>, Н. Н. Полещук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск

✉ micro.87@mail.ru

### Аннотация

Существует особый класс инфекционных трансмиссивных нейродегенеративных патологий, которые могут передаваться от носителя к восприимчивому организму. Эти болезни связаны с aberrантно свернутым амилоидоподобным прионным белком, названным PrP<sub>Sc</sub> или PrP<sub>27-30</sub> [1]. Для этих заболеваний наиболее чувствительным методом диагностики является постмортальный гистологический анализ ткани мозга в сочетании с электронной и атомно-силовой микроскопией [2].

**Цель работы** — выделить из мозговой ткани инфекционные  $\beta$ -амилоиды и дать их ультраструктурную и наноскопическую характеристику.

### Материалы и методы исследования

В основу данной работы положены результаты исследования двух клинически подтвержденных случаев болезни Крейтцфельда — Якоба (БКЯ) за период 2018–2022 гг. Выделение прионного PrP белка проводилось по процедуре, заключающейся в лизисе мозговой ткани, ее гомогенизации, фенол-хлороформной экстракции, суспендировании в 1 % додецилсульфате натрия, преципитации в изопропанол. Далее выделенный белок разделяли на отдельные аликвоты и хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до использования.

*Электронная микроскопия.* Анализу подвергались аликвоты прионного PrP белка, предварительно обработанные протеиназой К (20 мкг/мл), а затем негативно окрашенные с использованием 1,5 % р-ра фосфорновольфрамовой кислоты. Исследование проводили на микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при увеличении  $\times 60\,000$ – $200\,000$ .

*Атомно-силовая микроскопия.* В работе использовали тейпинговые микронзонды NSC15/Al BS (константа жесткости — 3 Н/м, резонансная частота — 60 кГц, радиус —  $< 10$  нм). Топографические изображения различных патологических белковых структур (шаг разведения  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ ), нанесенных на гидрофильную слюдяную поверхность, получены на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Bruker, США), оборудованном J-сканером. Обработку микрофотографий проводили с использованием программ Gwyddion 2.53, WSxM 5.0 Develop 9.1.

### Результаты

Патогистологические изменения при БКЯ ограничивались только ЦНС и проявлялись, как правило, в структурно-модификационных дистрофических изменениях клеточных элементов ткани мозга с формированием картины типичной губкообразной энцефалопатии. Во всех случаях регистрировалась характерная гибель нейронов на фоне центрального хроматолиза, вакуолизации цитоплазмы, аксонов и дендритов. Наблюдались признаки гипертрофии и пролиферации астроглии. При ультраструктурном анализе в дендритах и периаксиальных клеточных элементах визуализировались скопления фибрилл с периодическим перекрестом и диаметром 12–16 нм. Филаменты сравнительно одинакового диаметра имели все морфологические признаки  $\beta$ -амилоида.

*Ультраструктурный и наноскопический анализ  $\beta$ -амилоидов.* В анализируемых белковых фракциях мозга выявлено несколько типов протеазорезистентных полиморфных глобулярно-фибрилярных структур: 1) глобулы или сферы размером 9–20 нм; 2) палочки ( $l = 100$ – $200$  нм,  $d = 10$ – $20$  нм); 3) филаменты ( $l = 280$ – $1500$  нм,  $d = 10$ – $20$  нм). Филаменты характеризовались строго специфической субструктурой: при скручивании формируются нити, состоящие из спирально-намотанных протофиламентов или плоских цилиндров, разделенных перемычкой шириной 8–10 нм. По результатам атомно-силовой микроскопии дополнительно идентифицированы специфические фибриллярные структуры, представляющие собой спирально закрученные элементы, намотанные друг на друга с шагом 40–50 нм и соединенные перемычкой.

### Заключение

Вариации в субструктуре прионовых палочек или фибрилл могут определять штаммоспецифические свойства возбудителей, диапазон их восприимчивости к клеткам хозяев, в которых происходит репликация и селекция отдельных вариантов прионов. Выявление в образцах гетерогенных по наноггеометрии белковых субструктур

прионов актуально для дифференциации различных клинико-патологических фенотипов болезни Крейтцфельдта — Якоба, которые определяют степень выраженности и тяжесть течения заболевания.

**Литература**

1. Aneeqa N., Saima Z., Inga Z. Neurodegenerative proteinopathies in the proteoform spectrum — Tools and Challenges // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. P. 1–15.
2. Sigurdson C. J., Bartz J. C., Glatzel M. Cellular and molecular mechanisms of prion disease // Annual Review of Pathology. 2019. Vol. 14. P. 497–516.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫДЕЛЕННОГО В РАЗНЫХ РАЙОНАХ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Д. А. Бабошко<sup>1</sup>, И. П. Осипова<sup>1</sup>, А. И. Кузьмин<sup>2</sup>, О. А. Рожков<sup>2</sup>, А. В. Тотменин<sup>1</sup>, М. В. Флеер<sup>2</sup>, Н. М. Гашникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup> Управление ветеринарии Коченёвского района, Коченёво

✉ baboshko\_da@vector.nsc.ru

### Аннотация

В работе представлены данные о распространенности и разнообразии вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) в Новосибирской области. Исследовано 497 образцов крови коров из частных подворий и крупных животноводческих хозяйств. По результатам ПЦР-анализа ДНК ВЛКРС была выявлена в 344 исследованных образцах. Для каждого из них получены и расшифрованы вирус-специфические участки генома (env). Сравнительный филогенетический анализ ВЛКРС позволил выявить особенности распространения отдельных генотипов вируса в данном регионе.

### Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота — это ретровирус с онкогенным потенциалом, он является этиологическим агентом энзоотического лейкоза крупного рогатого скота, который широко распространен во всем мире. Инфекция, вызванная ВЛКРС, наносит серьезный ущерб животноводству. Также ВЛКРС может быть одним из факторов возникновения ряда онкологических заболеваний у людей.

**Цель исследования** — провести сравнительный анализ пораженности поголовья скота ВЛКРС и распределения генотипов вируса в разных районах Новосибирской области (НСО).

### Материалы/методы

Исследовано 497 образцов крови коров из Коченевского, Тогучинского, Болотнинского и Татарского районов НСО. С помощью лабораторного набора праймеров получены, расшифрованы и исследованы фрагменты ВЛКРС протяженностью 1 000 п.н., кодирующие область гена env.

### Результаты

На первом этапе работы сбор образцов осуществлялся как в частных подворьях, так и в крупном животноводческом хозяйстве Коченёвского района НСО. В частных подворьях было собрано 147 образцов, положительными по ПЦР были 48 проб (32,6 %). Количество зараженного вирусом КРС в населенных пунктах варьировало от 0 до 79 %. Также было собрано 200 образцов крови в животноводческом хозяйстве на территории Коченёвского района, положительными были 143 пробы на ВЛКРС (72 %). Первый этап работы позволил заключить, что наибольшая пораженность ВЛКРС в крупных животноводческих хозяйствах. Поэтому второй этап работы включал в себя сбор образцов в крупных хозяйствах Татарского, Тогучинского и Болотнинского районах НСО (по 60 образцов в каждом). Забор крови осуществляли у животных, положительных по анализу РИД на ВЛКРС, из них для 153 образцов были получены фрагменты ВЛКРС.

Филогенетический анализ, выполненный для выделенных ВЛКРС, позволил отнести 250 исследованных ВЛКРС к генотипу 4, 79 вариантов вируса — к генотипу 7. В одном населенном пункте в частных подворьях был обнаружен только генотип 7 ВЛКРС, а генотип 4 был широко распространен в остальных населенных пунктах. ВЛКРС из Тогучина в данной выборке (примерно 80 % образцов) были представлены в основном генотипом 7, но также имелся кластер внутри генотипа 4 ВЛКРС с высоким уровнем поддержки группы с образцами из ООО «Раздольное».

В случае Татарского региона образцы ВЛКРС образуют кластеры как в генотипе 4, так и в генотипе 7 ВЛКРС. Кластеризация с образцами, собранными в Коченёвском, Болотном и Тогучинском районах, обладает низким коэффициентом поддержки, так как этот регион территориально удален от остальных, представленных в выборке.

Из представленных в выборке ВЛКРС Коченёвского района присутствуют два генотипа ВЛКРС, кластеризующихся как с Болотнинским районом, так и с Тогучинским, так как в данном регионе проводится активная программа по закупке племенного скота из других регионов России.

### Выводы

В НСО циркулируют генотипы 4 и 7 ВЛКРС, первый значительно преобладает. Отмечаются отдельные кластеры ВЛКРС, общие для разных районов НСО: это может быть связано с закупкой племенного скота из дру-

гих регионов, а также искусственным осеменением. Неправильная стерилизация медицинских инструментов при проведении ветеринарных процедур, татуировании и проколов ушей крупного рогатого скота также может стать причиной распространения ВЛКРС среди животных, на что указывает выявление генетически близких штаммов вируса в хозяйстве или в отдельных населенных пунктах. Результаты данного исследования подтверждают актуальность молекулярно-генетических исследований ВЛКРС для разработки эффективных мероприятий по оздоровлению и мониторингу не только для крупных сельхоз предприятий, но и частных подворий крупного рогатого скота в России.

## НОВЫЕ ВИРУСЫ ГРЫЗУНОВ В ЭНДЕМИЧНЫХ ПО ГЛПС РАЙОНАХ

Ю. И. Булычева<sup>1</sup>, А. М. Бутенко<sup>1</sup>, Т. А. Маркина<sup>2</sup>, Т. К. Дзагурова<sup>3</sup>, С. В. Альховский<sup>1</sup><sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва<sup>2</sup>Окский государственный природный биосферный заповедник, Рязань<sup>3</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова  
РАН, Москва

✉ boulychevayuli@yandex.ru

## Аннотация

Рыжие полевки (*Myodes glareolus*) являются основным резервуаром для вируса Пуумала (*Orthohantavirus, Hantaviridae*) — возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Согласно последним данным, эти грызуны также могут быть резервуаром для множества новых неизвестных вирусов. Данная работа посвящена изучению новых вирусов, выделенных от рыжих полевков в районах, эндемичных по ГЛПС.

Грызуны (*Rodentia*) — важнейший природный резервуар множества вирусных инфекций человека и животных. Рыжая полевка является резервуаром для вируса Пуумала — возбудителя ГЛПС. Известно, что у этих грызунов также обнаружены вирусы, принадлежащие к 13 различным семействам (*Arenaviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Poxviridae* и т. д.). Наибольший интерес вызывают вирусы с экологией, схожей с хантавирусами, поскольку они обладают временной или постоянной экспозицией к человеку.

Целью настоящей работы стало изучение новых зоонозных вирусов, ассоциированных с рыжими полевками.

Вирус рыжих полевков (ВРП), принадлежащий к роду *Narmovirus* семейства *Paramyxoviridae*, был выделен в Башкирии в 1973 году из почек этих грызунов. Методом гнездовой ПЦР было обследовано 738 суспензий органов (легкие и почки) рыжих полевков из разных регионов России для обнаружения РНК ВРП. Из них выявлено девять положительных, включая две (из 127 обследованных проб) в Воронежской области, одну (из 200 проб) в Ульяновской области, и шесть (из 171 пробы) в Рязанской области. Таким образом, зараженность рыжих полевков на обследованных территориях составила от 0,5 % (Ульяновская обл.) до 3,5 % (Рязанская обл.). Положительные пробы были секвенированы. В результате нами показано, что циркулирующая популяция ВРП гетерогенна, а различия между штаммами могут достигать 10 % по анализируемому гену нуклеокапсида (*N*). На дендрограмме штаммы ВРП формируют две ветви, одна из которых включает пробы из Ульяновской и Рязанской областей, а вторая — штаммы из Воронежской области и Башкирии.

Новый неизвестный вирус, предварительно названный **вирусом Олтуш**, был выделен из органов рыжей полевки в 1975 году в Брестской области Беларуси. Геном вируса Олтуш был секвенирован методом NGS на платформе MiSeq (Illumina). По результатам полногеномного секвенирования вирус относится к роду *Parechovirus B* семейства *Picornaviridae*. Изучение распределения генетической схожести вируса Олтуш с другими вирусами рода *Parechovirus B* по нуклеотидной и аминокислотной последовательности полипротеина показало, что вирус Олтуш имеет наибольшую схожесть (82 % н. о. при сравнении полных геномов) с вирусом Юнган (*Ljungan virus*), впервые изолированным от рыжей полевки в Швеции.

При проведении полногеномного секвенирования положительной пробы на ВРП из Ульяновской области был обнаружен геном нового вируса, названного **хепевирусом полевков**. Сравнение полных геномов показало, что вирус, возможно, формирует новую ветвь в семействе *Hepeviridae*. После обнаружения нового хепевируса была разработана ПЦР тест-система. С ее помощью были обследованы 95 проб из Ульяновской области и 74 пробы из Воронежской области, упомянутые ранее. В результате были обнаружены две положительные пробы в Ульяновской области. Таким образом, зараженность полевков в Ульяновской области составила 2 %.

В результате была установлена принадлежность хепевируса и вируса Олтуш к семействам *Hepeviridae* и *Picornaviridae* соответственно. Установлена циркуляция вируса рыжих полевков и хепевируса полевков на территории Европейской части России.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ КАК МАРКЕР НАПРЯЖЕННОСТИ  
ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ГЕПАТИТА В (*HEPADNAVIRIDAE*:  
*ORTHOHEPADNAVIRUS*: *HEPATITIS B VIRUS*) (ВГВ)**

Н. В. Власенко, С. Н. Кузин, З. С. Родионова

Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

✉ nvzuz@mail.ru

**Аннотация**

Результаты проведенного регрессионного анализа позволили установить ассоциацию полиморфизма rs1800795 гена *IL-6* с группой нонреспондентов (< 10 МЕ/л) после проведенного курса вакцинации против ВГВ: генотип GG ( $p = 0,0074$ ; ОШ = 1,85; 95 % ДИ = 1,18–2,9) статистически значимо чаще обнаруживается в группе с концентрацией анти-НВс < 10 МЕ/л относительно группы > 100 МЕ/л.

Вакцинация населения, проводимая на территории РФ в рамках реализации национальной программы по элиминации ВГВ, показала себя эффективным инструментом, и в настоящее время достигнуто значительное улучшение эпидемической ситуации в стране. Однако результаты ряда исследований, посвященных изучению формирования поствакцинального иммунитета, свидетельствуют о наличии среди привитых в соответствии с рекомендациями (трехкратно по схеме 0–1–6 месяцев) 5–10 % «нон-респондентов», у которых нет протективного уровня специфических антител.

Детерминантами, определяющими эффективность иммунного ответа, могут являться варианты строения генов протеинов, вовлеченных в процессы иммуногенеза. К такого рода вариантам относятся однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП).

Изучаемую группу составили медицинские работники ФГАУ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава России и ГБУЗ «ГКБ им. В. П. Демикова ДЗМ» ( $n_{\text{сумм}} = 579$ ). Были проведены серологические исследования методом ИФА с использованием набора реагентов и ДС-ИФА-АНТИ-НВс (НПО ООО «Диагностические системы», Россия) в соответствии с инструкциями производителя для выявления и дальнейшего исключения лиц с наличием анти-НВcore класса IgG, характеризующих наличие постморбидного иммунитета. С использованием набора реагентов ДС-ИФА-АНТИ-НВс аналогичным методом были определены концентрации анти-НВс. Согласно выявленной концентрации исследуемая группа была разделена на три подгруппы со значениями 1) > 100 МЕ/л, 2) 10–100 МЕ/л и 3) < 10 МЕ/л. В качестве группы сравнения была определена подгруппа с концентрацией анти-НВс > 100 МЕ/л.

Для исследования был отобран следующий ряд ОНП генов цитокинов: *IL-1B* (rs1143634, rs1143627), *IL1RN* (rs4251961, rs419598), *IL6* (rs1800795), *IL-10* (rs1800896). Пробоподготовка осуществлялась с применением реагента «Гемолитик» и набора реагентов «Рибо-ПРЕП» (АмплиСенс, Россия). Методика определения полиморфизмов основана на детекции аллелей ОНП с использованием конформационно блокированных (LNA) аллель-специфичных зондов. Верификация полученных результатов, проведена при помощи секвенирования по Сенгеру.

Выявление ассоциативной связи вариантов строения генов с напряженностью поствакцинального иммунитета против ВГВ было произведено при помощи логистического регрессионного анализа в рамках кодоминантной, доминантной, рецессивной и сверхдоминантной моделей. Статистически значимыми принимали значения при  $p < 0,01$ .

В результате проведенного исследования выявлено 14,3 % ( $n = 83$ ) лиц с наличием анти-НВcore. Группа с отрицательным анти-НВcore была разделена следующим образом:  $n = 202$  с концентрацией анти-НВс > 100 МЕ/л,  $n = 151$  с концентрацией 10–100 МЕ/л и  $n = 143$  со значениями < 10 МЕ/л. Группа сравнения соответствовала распределению Харди — Вайнберга. Результаты проведенного регрессионного анализа позволили установить ассоциацию полиморфизма rs1800795 гена *IL-6* с группой нонреспондентов (< 10 МЕ/л). В рамках доминантной модели GG vs GC-CC, генотип GG ( $p = 0,0074$ ; ОШ = 1,85; 95 % ДИ = 1,18–2,9) статистически значимо чаще обнаружен в группе с концентрацией анти-НВс < 10 МЕ/л относительно группы > 100 МЕ/л. В подгруппе с промежуточными значениями анти-НВс 10–100 МЕ/л ассоциативной связи с изучаемыми ОНП не выявлено.



## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОТИВЫ НЕТРАСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА И БЕЛКОВ NS3, NS5 МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ФЛАВИПОДОБНОГО KINDIA TICK VIRUS И ИХ МОДЕЛИРОВАНИЕ

А. А. Гладышева<sup>1,2</sup>, А. В. Гладышева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово  
<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ glastas707@gmail.com

### Аннотация

Kindia tick virus (KITV) — новый сегментированный флавиподобный вирус семейства *Flaviviridae*, переносимый клещами и потенциально патогенный для человека. В ходе данного исследования были произведены моделирование и анализ пространственных структур вирусных белков и 5'- и 3'-нетранслируемых областей РНК (UTR) двух штаммов KITV, в результате чего установлено наличие структурного и функционального сходства KITV с «классическими» флавивирусами.

Kindia tick virus — новый сегментированный флавиподобный вирус семейства *Flaviviridae*, переносимый клещами и потенциально патогенный для человека. Геном KITV распределен на четыре коротких сегмента и представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, кодирующей пять вирусных полипептидов. Каждый сегмент генома имеет уникальные 5'- и 3'-UTR. О структурно-функциональной организации 5'- и 3'-UTR РНК KITV известно мало, хотя предполагается, что именно эти районы генома предопределяют репликацию вируса в клетках беспозвоночных и млекопитающих. При этом за последние несколько лет сегментированные флавиподобные вирусы обнаружены почти на всех континентах, что показывает их «успешность» в виросфере Земли.

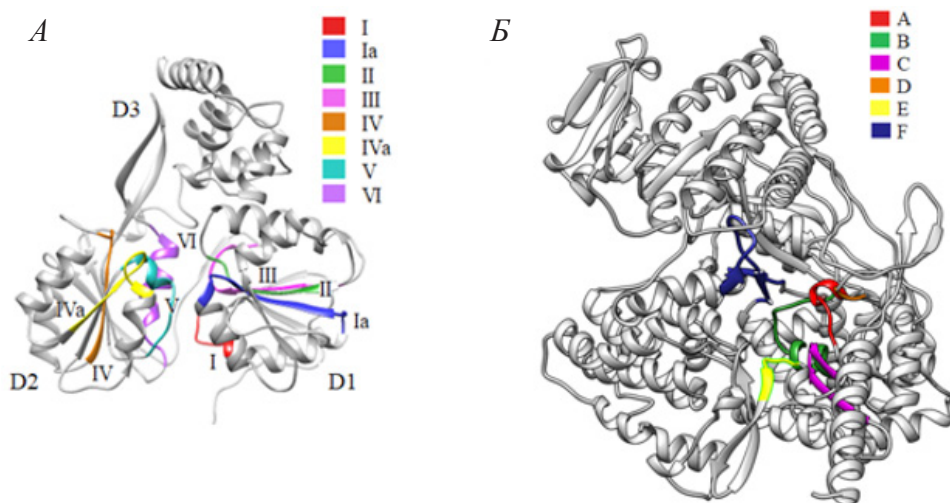
В данном исследовании с помощью программ AlphaFold2, Vienna RNA Fold, UNA mFold, RNAstructure было выполнено моделирование пространственных структур вирусных белков KITV и анализ 5'- и 3'-UTR РНК двух штаммов KITV — KITV/2018/1 и KITV/2018/2, обнаруженных в клещах на территории Гвинейской Республики в 2018 году.

Обнаружено, что белки VP1-VP3 KITV (сегменты 2 и 4 генома) не имеют каких либо аналогов среди известных вирусных белков, за исключением нескольких схожих многокомпонентных вирусов. Полученные пространственные модели VP1-VP3 имели слишком низкий коэффициент достоверности. Однако модели NS3 (сегмент 3) и NS5 (сегмент 1) обладали высоким уровнем достоверности рLDDT AlphaFold2 и высоким уровнем топологического сходства с пространственными структурами белков вируса Зика при низком уровне схожести (~30 %) их аминокислотных последовательностей. Установлено, что белок NS3 KITV содержит хеликазный домен и мотивы I, Ia, II, III, IV, IVa, V, VI этого домена (рис. 1А). Белок NS5 содержит домены метилтрансферазы и РНК-зависимую РНК-полимеразу с субдоменами пальцев, ладони и большого пальца, а также характерные мотивы А, В, С, D, E, F (рис. 1Б). У обоих белков обнаружены высококонсервативные аминокислотные остатки, характерные как для несегментированных флавивирусов, так и для KITV.

Также выявлены и аминокислотные замены в белках NS3 и NS5 у различных штаммов KITV. Установлено, что они локализируются у белка NS5 в положениях: 135 — альфа-спираль 5 ( $\alpha$ -5), 217 — петля между  $\alpha$ -8 и бета-листом 7 ( $\beta$ -7), 233 —  $\alpha$ -9, 674 —  $\alpha$ -27, 908 —  $\alpha$ -37; у белка NS3 в положениях: 476 — петля между  $\beta$ -7 и  $\beta$ -8, 625 — петля между  $\alpha$ -10 и  $\beta$ -16, 673 —  $\alpha$ -13.

Вторичная структура 5'- и 3'-UTR 1-го сегмента характерна для KITV и представлена двумя стеблевыми петлями (SL-1, SL-2), а для 5'-UTR — Y-1 структурой. В SL-1 5'-UTR обнаружен сайт связывания аутоантигена La. В 5'- и 3'-UTR выявлены 5'-DAR и 3'-DAR мотивы, которые принимают участие в процессе циклизации генома, облегчая этап инициации репликации. В 3'-UTR обнаружен высококонсервативный пентануклеотид 5'-CACAG-3', характерный для флавивирусов.

Вторичная структура 5'-UTR 2-го сегмента представлена SL-1, SL-2 и SL-3, содержит регион связывания с La и регионы 5'-DAR и 3'-DAR. Вторичная структура 3'-UTR у штаммов KITV/2017/1 и KITV/2018/2 представлена структурами Y-1, Y-2, Y-3, а у KITV/2018/1 — структурами SL-1, Y-1, Y-2. Структуры Y-1, Y-2 являются консервативными, а Y-3 — переменными. Замены C<sub>47</sub>→T<sub>47</sub> и C<sub>57</sub>→T<sub>57</sub> в 3'-UTR KITV/2018/1 приводят к изменению Y-3 на SL-1. Также видоизменения Y-3 связаны с наличием делеции длиной 35 нуклеотидов в данном регионе, захватывающей область повтора R4 у штамма KITV/2017/1, состоящего из двух последовательностей длиной 40 нуклеотидов и содержащего пентануклеотид 5'-CACAG-3' в 7-ой шпильке. Кроме того, в 3'-UTR обнаружено два псевдоузла: PK1 и PK2. PK1 имеется у всех штаммов KITV, PK2 обнаружен только у штамма KITV/2018/1. 5'- и 3'-UTR обладают пятью комплементарными и тремя гомологичными последовательностями.



Модели пространственной организации вирусных белков NS3 и NS5. (А) Пространственная модель NS3-Hel KITV/2018 1 с консервативными мотивами I-VL (Б) Пространственная модель белка NS5 KITV/2018/1 с консервативными мотивами A-F

Вторичная структура 5'-UTR 4-го сегмента представлена SL-1, SL-2 и SL-3, а 3'-UTR 4-го сегмента представлена двумя Y-структурами. Однако схожих с флавивирусами мотивов обнаружить не удалось. Это показывает, что роль 5'- и 3'-UTR разных сегментов KITV сложнее, чем представлялось ранее. Высказано предположение, что для обеспечения репликации генома многокомпонентных сегментированных флавиподобных вирусов необходима согласованная экспрессия 5'- и 3'-UTR всех сегментов генома.

Таким образом, в ходе данной работы с помощью современных методов моделирования впервые получены трехмерные модели вирусных белков NS3 и NS5 и 5'- и 3'-UTR. Полученные результаты говорят о наличии структурного и функционального сходства сегментированных флавиподобных вирусов и флавивирусов. Они указывают на их возможные эволюционные взаимосвязи. Все это приближает нас к пониманию структуры и функций вирусных белков многокомпонентных флавиподобных вирусов, а также механизмов реализации их генетической информации.

## ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ШТАММА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ТЕСТ-ПОВЕРХНОСТЕЙ

Т. А. Гостева, О. П. Оськина, В. В. Золин, В. В. Солодкий

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ Gosteva.tanya.92@mail.ru

### Аннотация

Представлены результаты исследования по оценке жизнеспособности вируса SARS-CoV-2 на поверхностях, часто используемых в повседневной жизни.

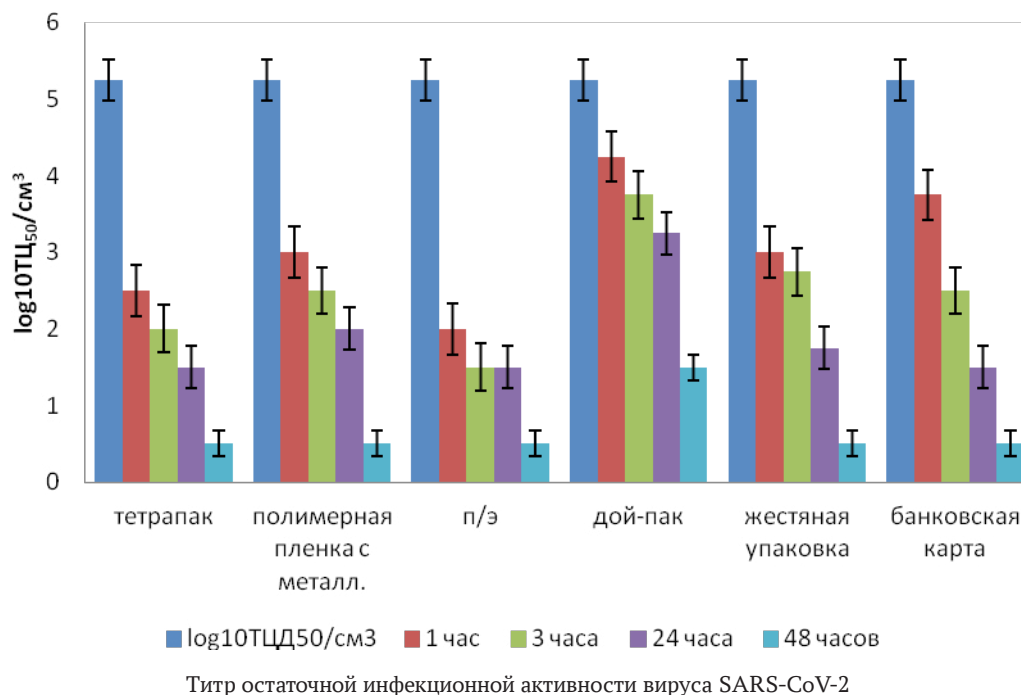
**Актуальность:** ранее нами была изучена остаточная инфекционная активность вируса SARS-CoV-2 на тест-поверхностях, которые наиболее часто применяются в оснащении и отделке лабораторных помещений: нержавеющая сталь, стекло, пластик, керамическая плитка и т. д. [1]. В настоящей работе мы исследовали остаточную инфекционную активность вируса SARS-CoV-2 на тест-поверхностях, с которыми ежедневно контактирует значительная часть населения в торговых организациях и банках.

**Цель** данной работы — определение динамики остаточной инфекционной активности вируса SARS-CoV-2 на различных типах тест-поверхностей.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследований было взято шесть тест-поверхностей: многослойная упаковка (тетрапак), упаковка из полимерной металлизированной пленки, полиэтиленовая упаковка, гибкая упаковка из многослойной ламинированной пленки (дой-пак), жестяная упаковка (консервная банка), различные пластиковые банковские карты. Исследования проводили с использованием коронавируса SARS-CoV-2, штамм hCoV-19/Russia/Omsk-202118-1707/2020, полученного из Государственной коллекции возбудителей инфекционных болезней, риккетсиозов, функционирующей на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, и наработанного с титром  $5,0 \pm 0,3 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ .

Работа была выполнена на линии культуры клеток Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки). Для определения остаточного титра по ЦПД<sub>50</sub> (TCID<sub>50</sub>) на исследуемые образцы тест-поверхностей нанесли вирусосодержащую суспензию из расчета 0,5 мл/100 см<sup>2</sup>. После экспозиции 1 час, 3 часа, 24 часа и 48 часов с поверхностями смыли остаточный вирус раствором Хенкса. Полученный элюат наносили на культуру клеток Vero E6 и методом титрования осуществляли контроль инфекционной активности коронавируса. Определение



величины ТЦД<sub>50</sub> проводили по методу Спирмена — Кербера в модификации Ашмарина — Воробьева. [2; 3]. Исследования проводили в соответствии с требованиями руководства «Р 4.2.3676-20. 4.2. Биологические и микробиологические факторы. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. Руководство» (утв. Роспотребнадзором 18.12.2020)

#### **Результаты исследования**

Проведенные исследования показали, что коронавирус SARS-CoV-2 сохраняет свою инфекционную активность на исследованных тест-поверхностях и банковских картах в течение 24 часов, а на упаковке типа дой-пак — до 48 часов. Результаты изучения остаточной инфекционности коронавируса SARS-CoV-2 представлены на рисунке.

Таким образом, проведенные исследования показали, что коронавирус SARS-CoV-2 может сохранять свою инфекционную активность на всех исследованных типах тест-поверхностей, которые широко применяются в повседневной жизни, в течение как минимум 24 часов и, соответственно, контакт с этими потенциально загрязненными коронавирусом упаковками или банковскими картами может привести к заражению человека.

#### **Литература**

1. Золин В. В., Оськина О. П., Солодкий В. В., Еремина М. Н., Давыдов Г. Ф., Гостева Т. А. Оценка жизнеспособности коронавируса SARS-CoV-2 на различных типах тест-поверхностей, а также в питьевой и морской воде // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 2. С. 108–113. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-108-113>
2. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976. 598 с.
3. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз. Ленинградское отделение, 1962. 180 с.

## СПОСОБНОСТЬ ПРОНИКНОВЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТИОФОСФАТНЫЕ МОДИФИКАЦИИ, В ПЕРВИЧНЫЕ И ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Л. Г. Готфрид, Н. М. Гашникова

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

✉ gotfrid\_lg@vector.nsc.ru

### Аннотация

В данной работе при изучении модифицированных олигонуклеотидов в качестве средств генной терапии была исследована методами лазерной микроскопии и проточной цитофлюориметрии способность олигонуклеотидов, содержащих тиофосфатную модификацию, проникать внутрь первичных и перевиваемых клеток человека.

Внедрение модификаций в конструкцию олигонуклеотидов (ОН) позволяет влиять на способность ОН проникать к указанной мишени внутри клетки, а также способствует повышению их устойчивости к действию нуклеаз, что необходимо для изучения ОН как средств генной терапии при профилактике и терапии ВИЧ-инфекции.

Цель данной работы — исследование эффективности проникновения модифицированных олигонуклеотидов в первичные клетки крови человека и лимфоидные клетки человека МТ-4 без использования трансфецирующих агентов и изучение их внутриклеточной локализации.

Были исследованы образцы ОН, имеющие тиофосфатную модификацию. Данная модификация была изучена при самостоятельном проникновении в клетки и в дуплексе с ОН-«доставщиком», содержащим три остатка додецила. Флюорохромную метку FAM несли непосредственно ОН. Таким образом, фиксация сигнала в клетке указывала на проникновение целевого ОН. Образцы имели одинаковую исходную концентрацию ( $10^{-4}$  М). Исследование проводили на первичных мононуклеарных клетках (МПК) человека из периферической крови здорового донора. МПК получали центрифугированием в градиенте плотности фикола (1,077 г/мл), отмывали и культивировали в среде RPMI с добавлением 5 % FBS, L-глутамин, фитогемагглютинина (ФГА). Для визуализации общего вида клеток использовали систему DIC-контраста в проходящем свете; для детекции ОН с FAM-красителем использовали лазерную линию 488 нм (зеленый цвет). Исследование проводили с помощью сканирующего лазерного микроскопа LSM 780 NLO (ZEISS).

Показано, что ОН в тиофосфатной модификации способен как самостоятельно, так и в дуплексе с «доставщиком» эффективно проникать в МПК человека. Также было выявлено отличие в проникновении дуплекса и отдельно ОН. Эффективность трансфекции ОН при самостоятельном проникновении в клетки была выше, чем при проникновении в качестве дуплекса с ОН-«доставщиком», при этом сигнал FAM для всех образцов интенсивно выявлялся и был диффузно распределен как в цитоплазме, так и в органеллах клеток.

Для подтверждения полученных результатов был проведен анализ эффективности проникновения в клетки ОН на проточном цитометре с визуализацией Amnis FlowSight. Анализ и интерпретация данных проводилась с использованием программы Ideas. Для оценки проникновения ОН использовали лимфоидные клетки человека МТ-4. Исследуемые олигонуклеотиды были также мечены флюорохромом FAM, что позволяло регистрировать их проникновение в клетку.

Полученные результаты показали, что эффективность проникновения ОН с тиофосфатной модификацией оказалась близкой к 100 %, при этом способность проникать в клетки данных ОН в дуплексе с «доставщиком» снижалась на 20 %. Данные, полученные с использованием проточного цитофлюориметра Amnis FlowSight с визуализацией, согласуются с данными, полученными при микроскопических исследованиях.

Таким образом, исследование показало, что модификация ОН существенно влияет на его способность проникать в клетки человека. Высокая эффективность проникновения таких олигонуклеотидов была подтверждена как для перевиваемых лимфоидных клеток, так и для первичных клеток крови человека. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ОН с тиофосфатной модификацией перспективны в качестве базовых соединений для разработки средств генной терапии.

## ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИРКУЛЯЦИИ КОРОНАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ\*

И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, В. А. Помулев, А. А. Алёхин, И. С. Старостин, А. А. Калымбетов, О. П. Хрипко

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

✉ diu1000@mail.ru

### Аннотация

Коронавирусы человека — это РНК-содержащие вирусы, относящиеся к семейству *Coronaviridae*. COVID-19 является инфекционным заболеванием, вызванным коронавирусом SARS-CoV-2. Осложнения в результате инфицирования COVID-19 могут привести к поражению органов и систем, в том числе желудочно-кишечного тракта, дыхательной системы и т. д.

**Цель данной работы** — выявление сезонных коронавирусов человека из биологического материала, направляемого для проведения исследования на выявление новой коронавирусной инфекции COVID-19 из амбулаторного контингента поликлиник.

В лаборатории Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины ведутся исследования биологического материала (мазки из носоглотки и ротоглотки), поступающего от лечебно-профилактических учреждений Новосибирска и Новосибирской области, для выявления новой коронавирусной инфекции COVID-19 методом ОТ-ПЦР.

Нередки случаи, когда сезонные коронавирусы человека вызывают не только легкие острые респираторные вирусные и кишечные инфекции, но и могут быть причиной тяжелых вирусных пневмоний, как, например, при заболевании SARS-CoV-2 [1].

На сегодняшний день известны случаи, когда у пациентов, находящихся на лечении в моноинфекционных («ковидных») госпиталях с установленным диагнозом «вирусная пневмония», теста на COVID-19 показывает негативный результат. Из-за этого возникло предположение, что такая пневмония может быть вызвана иными коронавирусами человека [2].

Для проверки этого предположения была сформирована случайная выборка из 2 182 образцов материала, поступившего от пациентов, которые обратились за амбулаторной медицинской помощью с диагнозом ОРВИ, и проведено исследование на обнаружение в нем коронавирусов SARS-CoV-2, OC-43, HKU1, NL-63 и ОРВИ-229 (табл. 1). Для этого нами был применен метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Таблица 1

### Результаты, полученные в ходе лабораторных исследований

	SARS-CoV-2	OC43	HKU1	NL-63	ОРВИ-229
Количество позитивных образцов	1110	6	0	1	6

Анализ результатов показал наличие пересечений нескольких коронавирусов человека (табл. 2).

Таблица 2

	SARS-CoV-2 + ОРВИ-229
Количество позитивных образцов	3

При этом такие же исследования, проведенные нами в 2021 году, показали несколько иные результаты [3] (табл. 3).

Таблица 3

	NL-63 + ОРВИ-229	OC43 + ОРВИ-229	SARS-CoV-2 + ОРВИ-229
Количество позитивных образцов	1	1	1

В настоящий момент сформирована выборка биологического материала от пациентов, находящихся на лечении в «ковидных» госпиталях Новосибирской области с диагнозом «вирусная пневмония», для проведения аналогичных исследований с целью подтверждения такого предположения.

\* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ» при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

**Литература**

1. В. Н. Тимченко, В. Ф. Суховецкая, Т. М. Чернова, Т. А. Каплина, М. Д. Субботина, О. В. Булина, М. М. Писарева. Результаты 5-летнего мониторинга за циркуляцией сезонных коронавирусов у госпитализированных детей в препандемическом периоде // *Детские инфекции*. 2021. Т. 1. № 1(74). С. 5–11. doi:10.22627/2072-8107-2021-20-1-5-11
2. E. R. Gaunt, A. Hardie, E. C. J. Claas, P. Simmonds, K. E. Templeton. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method // *Journal of Clinical Microbiology*. 2010. P. 2940–2947. doi:10.1128/JCM.00636-10
3. И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, В. А. Помулев, О. П. Хрипко. Результаты исследования циркуляции сезонных коронавирусов и их пересечения с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 в Новосибирской области // VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2021 : Сборник тезисов конференции, проходившей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2021, Научоград Кольцово, 5–8 октября 2021 года. Новосибирск: НГУ. 2021. С. 198–199.

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВГС СУБТИПА 1В НА ТЕРРИТОРИЯХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ КИРГИЗИЯ\*

В. Е. Екушов<sup>1</sup>, М. В. Сивай<sup>1</sup>, А. В. Тотменин<sup>1</sup>, Л. В. Максименко<sup>1</sup>, И. П. Осипова<sup>1</sup>, Т. М. Налимова<sup>1</sup>, М. П. Гашникова<sup>1</sup>, М. Р. Халиков<sup>1</sup>, У. З. Чокмоморова<sup>2</sup>, У. Т. Моторов<sup>3</sup>, Ж. К. Акматова<sup>2</sup>, Н. А. Асыбалиева<sup>2</sup>, Э. Б. Нарматова<sup>3</sup>, А. А. Бекболотов<sup>2</sup>, С. Е. Скударнов<sup>4</sup>, Т. С. Остапова<sup>4</sup>, С. В. Яценко<sup>4</sup>, Н. М. Гашникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Республиканский центр СПИД, Бишкек, Киргизия

<sup>3</sup>Ошский областной центр профилактики и борьбы со СПИДом, Ош, Киргизия

<sup>4</sup>Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД

✉ ekushov\_ve@vector.nsc.ru

### Аннотация

В современном мире остро стоит проблема элиминации вируса гепатита С (ВГС). Появление препаратов прямого противовирусного действия (ПППД) облегчило борьбу с ВГС, однако на данный момент ограничен выбор коммерческих тестов для определения мутаций устойчивости к противовирусным препаратам.

Цель данного исследования — изучить распространенность мутаций устойчивости ВГС субтипа 1b к ПППД в Республике Киргизия и Российской Федерации (на примере Красноярского края).

В рамках исследования были разработаны праймеры и подобраны условия ПЦР для получения фрагментов NS5A (ингибиторы NS5A) и NS5B (ингибиторы РНК-полимеразы) с длиной каждой последовательности от 1 200 до 1 500 п. н., включающих все основные мутации резистентности в своих регионах.

В 2021 году в сотрудничестве с центрами профилактики и борьбы со СПИД Республики Киргизия и Красноярского края нами были собраны образцы крови и проанализированы последовательности NS5A и NS5B ВГС 76 пациентов, из которых далее были отобраны 24 пациента с ВГС субтипа 1b.

Наш первый опыт применения данного подхода на практике позволил обнаружить высокий уровень распространенности мутаций лекарственной резистентности ВГС. Из проанализированных данных следует, что у 85 % пациентов в Республике Киргизия и у 67 % пациентов в Красноярском крае присутствует хотя бы одна мутация резистентности к ингибиторам NS5A, а для ингибиторов РНК-полимеразы (NS5B) мутации определяются у 46 % пациентов в Республике Киргизия, в Красноярском крае — у 89 %. Мутации резистентности к двум классам ПППД присутствуют у 46 % пациентов с ВГС в Республике Киргизия и у 67 % пациентов в Красноярском крае. Анализ мутаций производился при помощи сайта HCV-GLUE.

Самой распространенной мутацией резистентности для области NS5A является F/L37L(I) (устойчивость к даклатасвиру), выявленная у 62 % пациентов в Республике Киргизия и 67 % пациентов в Красноярском крае, а для NS5B — С/N316N (устойчивость к дасабувиру и софосбувиру), обнаруженная у 62 % пациентов в Республике Киргизия и у 89 % пациентов в Красноярском крае.

Данное исследование показало высокий уровень распространения мутаций резистентности ВГС субтипа 1b, в том числе мультиклассовой, в Республике Киргизия и Красноярском крае. Разработанный нами подход позволяет выполнять корректную детекцию и анализ мутаций резистентности ВГС к ПППД.

\* Работа выполнена в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации № 735-р от 02.04.2022.

© В. Е. Екушов, М. В. Сивай, А. В. Тотменин, Л. В. Максименко, И. П. Осипова, Т. М. Налимова, М. П. Гашникова, М. Р. Халиков, У. З. Чокмоморова, У. Т. Моторов, Ж. К. Акматова, Н. А. Асыбалиева, Э. Б. Нарматова, А. А. Бекболотов, С. Е. Скударнов, Т. С. Остапова, С. В. Яценко, Н. М. Гашникова, 2022



## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ SARS-COV-2: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРИАНТОВ ОМИКРОН И ДЕЛЬТА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

А. С. Есьман, К. О. Миронов, А. С. Черкашина, С. А. Саламайкина, А. Г. Голубева, В. Г. Акимкин

*ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва*

✉ esman@cmd.su

### Аннотация

К 20 января 2022 года в Российской Федерации на геновариант омикрон приходилось 43 % выявленных случаев заболевания COVID-19, на вариант дельта — 56 %. При этом фиксировался резкий рост заболеваемости (более 200 000 случаев в сутки). Учитывая отсутствие информации о риске тяжелого течения заболевания, связанного с новым геновариантом, требовались оперативные действия для комплексной оценки параметров текущего эпидемического процесса.

Для наблюдения за циркулирующими линиями SARS-Cov-2 на территории РФ применяются методы полногеномного и фрагментного секвенирования, которые в полном объеме отслеживают появление новых геновариантов. Используя эти данные, система эпидемиологического надзора оперативно реагирует введением ряда ограничительных мер или разработкой профилактических стратегий. Использование высокопропускных лабораторных методов позволяет в сжатые сроки характеризовать изоляты, вовлеченные в эпидемический процесс.

В связи с этим на основании Распоряжения Правительства РФ № 213-р от 10.02.2022 целью данной работы стала разработка высокопропускной масштабируемой методики для определения геновариантов дельта и омикрон SARS-CoV-2 с последующим ее внедрением в лабораторное звено санитарно-эпидемиологической службы центров гигиены и эпидемиологии (ЦГиЭ) для увеличения количества генотипируемых образцов.

Для разработки методик, основанных на ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), были выбраны две мутации S-белка линии B.1.617.2 (дельта) — L452R, P681R, а также четыре мутации S-белка линии B.1.1.529 (омикрон): delHV69-70, N501Y, delVYY143-145, ins214EPE.

ПЦР-РВ проводили с использованием амплификаторов роторного и планшетного типа с возможностью детекции флуоресцентного сигнала не менее чем по двум каналам. Амплификация проводилась с использованием универсальной программы, что позволило получить результат сразу по всем анализируемым мишеням: 1 цикл 95 °C в течение 15 минут, 45 циклов при температуре 95 °C — 10 секунд / 60 °C — 20 секунд. Детекция флуоресценции на этапе 60 °C по каналу для флуорофоров FAM и R6G.

Верификация выявленных мутаций проводилась с использованием методов секвенирования по Сэнгеру (Applied Biosystems, США) и пиросеквенирования (Qiagen, Германия).

Лабораторная методика для дифференцирования геновариантов дельта и омикрон выпускается в Научно-производственной лаборатории Центрального НИИ Эпидемиологии в форме расфасованных реагентов. На июль 2022 года произведен объем реагентов, достаточный для проведения 150 000 определений. Реагенты распространены по всем субъектам РФ.

Методика апробирована на 826 положительных образцах. Выявлено 474 образца геноварианта омикрон, 324 — геноварианта дельта, из которых для 21 образца определен сомнительный результат, для 9 образцов выявлена только одна мутация геноварианта омикрон. Аналитическая специфичность методики составила 100 %, что подтверждено при исследовании 160 случайных образцов методами секвенирования.

В рамках поручения руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 02/1167-2022-27 от 20.01.2022 был подготовлен проект методических рекомендаций «Методика определения геновариантов омикрон и дельта вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени», для методической и консультативной поддержки специалистов региональных ЦГиЭ создана горячая линия, а также проведены онлайн-семинары.

Увеличение доли определенных геновариантов за счет вовлечения в молекулярно-генетический мониторинг лабораторий, не имеющих оборудования для секвенирования, позволяет значительно снизить временные и финансовые затраты при мониторинге геновариантов, проводимом в рамках эпидемиологического надзора.

Такой подход представляет универсальный инструмент для выявления значимых мутаций в популяции SARS-CoV-2. Предложенный алгоритм использования позволяет скорректировать спектр детектируемых мишеней в зависимости от циркулирующих геновариантов и своевременно принять управленческие решения по проведению противоэпидемических мероприятий.

Учитывая вариабельность SARS-CoV-2, нами разрабатываются методики ПЦР-РВ, направленные на определение актуальных в эпидемиологическом отношении мутаций для определения сублиний B.1.1.529 (омикрон): BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 и BA.5.

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ ЛЕЙКОЦИТОВ В МАЗКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Н. С. Золотухина, О. П. Хрипко, С. М. Мирошниченко

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ nszolutuhina@frcftm.ru

**Аннотация**

Летальные осложнения при инфекции SARS-CoV-2, такие как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), являются последствиями цитокинового шторма. Цель исследования — изучение состава и морфологии лейкоцитов в периферической крови пациентов с вирусной пневмонией. Обнаружены нарушения морфологии клеток всех лейкоцитарных ростков, появление незрелых лейкоцитарных предшественников, клеточного дегриза, что способствует развитию цитокинового шторма.

**Введение**

Вирус SARS-CoV-2 демонстрирует сильные иммуногенные свойства, вызывая у некоторых пациентов цитокиновый шторм — патологическое состояние, при котором выработка большого количества цитокинов приводит к активации иммунных клеток, высвобождению новых цитокинов и замыканию петли положительной обратной связи. Цитокиновый шторм у больных вирусом SARS-CoV-2 рассматривается как одна из основных причин ОРДС.

Для вирусной пневмонии COVID-19 характерна лимфопения, которая является прогностическим показателем тяжести болезни. Таким образом, **целью** исследования являлось изучение влияния вируса SARS-CoV-2 на состав и морфологию лейкоцитов в периферической крови человека. Объектом исследования послужили образцы периферической крови людей ( $n = 23$ ), госпитализированных в Городскую клиническую больницу № 11 (Новосибирск) с марта по май 2021 года с вирусной COVID-19 пневмонией средней степени тяжести. Возраст пациентов: 33–73 года (ср. = 56; мед. = 57). В день госпитализации у пациентов был взят общий анализ крови и был сделан мазок крови. Мазки крови проанализировали под микроскопом Zeiss Axiovert 40 с окуляром  $\times 10$  и объективом  $\times 100$ .

**Результаты**

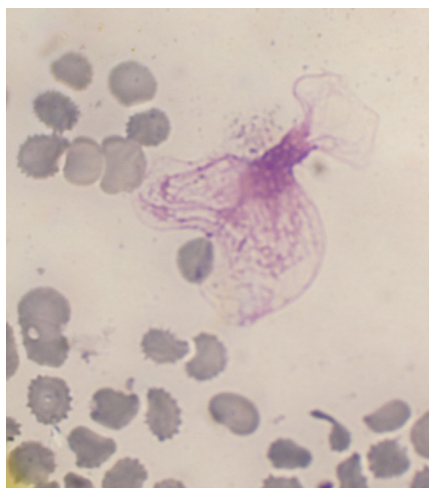
Морфологическое исследование показало картину различных вариантов клеточной гибели, включая гибель нейтрофилов посредством нетоза (рис. 1), а также хроматолиз и/или цитолиз (Х/Ц) всех типов лейкоцитов (рис. 2). Доля различных типов клеточной гибели у пациентов довольно сильно варьировалась (см. табл.). Доля Х/Ц нейтрофилов у пациентов, умерших в стационаре ( $33,18 \pm 11,33$ ), достоверно выше, чем у пациентов средней и тяжелой степени тяжести ( $3,60 \pm 6,54$ ) ( $p < 0,01$ , согласно критерию Манна — Уитни). Отношение числа нейтрофилов с хроматолизом и/или цитолизом к числу нейтрофилов с нетозом в группе умерших ( $4,49 \pm 4,07$ ) достоверно выше, чем в группе пациентов со средней и тяжелой степенью тяжести ( $0,65 \pm 1,20$ ) ( $p < 0,01$ , согласно критерию Манна — Уитни).

**Доля погибших клеток в мазках крови больных SARS-CoV-2**

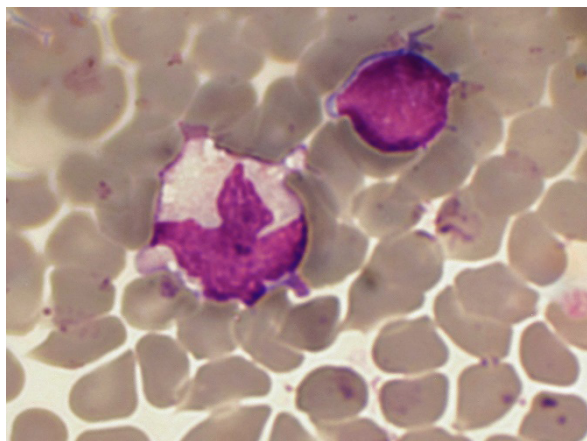
Виды клеточной гибели	Образцы от пациентов ср. и тяж. ст. тяжести, $n = 19$	Образцы от пациентов, умерших в стационаре, $n = 4$
нейтрофилы: Х/Ц, (ср.%)	$3,60 \pm 6,54$	$33,18 \pm 11,33$ * ( $p < 0,01$ )
лимфоциты: Х/Ц, (ср.%)	$0,29 \pm 1,18$	$11,55 \pm 9,84$
нейтрофилы: нетоз, (ср.%)	$13,26 \pm 9,51$	$16,18 \pm 12,79$
моноциты: Х/Ц, (ср.%)	$27,24 \pm 15,39$	$36,35 \pm 21,52$

У всех пациентов массовая гибель лейкоцитов сопровождалась появлением клеточного дегриза, являющегося триггером воспаления и замыкающего петлю положительной обратной связи, с формированием нового клеточного дегриза и цитокинового шторма, а также стимулировала кроветворение с выбросом в кровь незрелых бластных клеток и стромы.

Что касается лейкоцитарной формулы, то для наблюдаемые результаты можно охарактеризовать как гетерогенные. Общее количество лейкоцитов (WBC) колебалось в интервале от 3,6 до  $17,02 \cdot 10^9$  кл/л (ср. = 7,61; мед. = 7,49). Отмечалась тенденция к низкой клеточности у клинически более тяжелых больных, а также умерших больных (у умерших пациентов  $WBC < 3,9 \cdot 10^9$  кл/л).



*Рис. 1.* Нетоз — тип гибели с разрушением клеточной мембраны и формированием внеклеточных сетей из смеси ДНК, гистонов и внутриклеточных белков,  $\times 100$



*Рис 2.* Цитолиз и хроматолиз — тип гибели, при котором первично происходит расплавление клеточного содержимого (снизу на фото моноцит, сверху — лимфоцит), увеличение  $\times 100$

### **Заключение**

При инфицировании SARS-CoV-2 происходят качественные и количественные изменения лейкоцитов, включающие как массовую гибель клеток и клеточный дебрис в крови, так и появление незрелых лейкоцитарных предшественников и стромы.

Отношение числа нейтрофилов с хроматолизом и/или цитолизом и нейтрофилов с нетозом в день госпитализации может служить диагностическим критерием неблагоприятного прогноза. Возможно, это связано с тем, что нетоз является защитной реакцией организма, а клеточный лизис — это показатель истощения компенсаторных резервов организма и срыва адаптации.

## СКРИНИНГ ПРОИЗВОДНЫХ N<sup>6</sup>-БЕНЗИЛАДЕНОЗИНА ПО СПОСОБНОСТИ ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ПОЛИОМИЕЛИТА

Е. В. Карпова<sup>1,2</sup>, Е. С. Колпакова<sup>1,2</sup>, А. А. Зенченко<sup>3</sup>, В. Е. Ословский<sup>3</sup>, Л. И. Козловская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М. П. Чумакова РАН, Москва

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

✉ evg\_karpova@mail.ru

### Аннотация

В настоящее время достигнуты значительные успехи в реализации Глобальной инициативы по искоренению полиомиелита. Однако остается ряд территорий, где регистрируются вспышки и откуда вирус попадает в свободные от полиомиелита страны, приводя к параличу у заболевших. В рамках разработки низкомолекулярных препаратов против полиомиелита был проведен скрининг производных N<sup>6</sup>-бензиладенозина и выявлено несколько соединений с EC<sub>50</sub> в микромолярном диапазоне.

Полиовирусы относятся к виду *Enterovirus C* семейства *Picornaviridae*. Их подразделяют на серотипы 1, 2 и 3, при этом иммунитет к одному серотипу не защищает от заболевания, вызванного вирусом другого серотипа. Основным заболеванием, вызываемым полиовирусами, является полиомиелит. Инфекция проявляется во многих формах: легкое лихорадочное состояние, асептический менингит без паралича, а также вялые парезы и параличи. Несмотря на большие усилия Глобальной инициативы по искоренению полиомиелита, до сих пор регистрируются случаи паралитического заболевания на некоторых территориях, в основном в Африке и Южной Азии. С этих территорий вирус попадает в свободные от полиомиелита страны, где может вызвать случаи заболевания у невакцинированных по той или иной причине людей. В качестве меры специфической профилактики применяется только вакцинация, одобренного специфического противовирусного лечения данного заболевания не существует. В настоящее время аналоги нуклеозидов широко используются для противовирусной терапии. В этом исследовании мы провели скрининг производных N<sup>6</sup>-бензиладенозина против штаммов Сэбина трех типов вируса полиомиелита. Было обнаружено несколько соединений, которые в концентрациях в микромолярном диапазоне эффективны против двух штаммов.

Оценка противовирусной активности 25 производных N<sup>6</sup>-бензиладенозина [1; 2] против трех штаммов Сэбина трех типов полиовируса проводилась по ингибированию цитопатического действия (гибели зараженных клеток) в культуре клеток Нер2с [3].

Большинство соединений оказались неактивны против всех штаммов, либо показали способность ингибировать репродукцию штаммов в сравнительно высокой концентрации (EC<sub>50</sub> порядка 20 μM). Среди производных N<sup>6</sup>-бензиладенозина четыре соединения продемонстрировали способность ингибировать репродукцию штамма Сэбина 3-го типа (EC<sub>50</sub> менее 10 μM), два соединения проявили противовирусную активность в отношении штамма Сэбина 1-го типа (EC<sub>50</sub> менее 10 μM).

Таким образом, исследованные производные N<sup>6</sup>-бензиладенозина могут послужить основой для разработки эффективных препаратов для лечения полиовирусных инфекций.

### Литература

1. Drenichev M. S. et al. Cytokinin Nucleosides — Natural Compounds with a Unique Spectrum of Biological Activities // *Eur J Med Chem*. 2016. Vol. 111. P. 84–94.
2. Oslovsky V. E. et al. Fluorination of Naturally Occurring N6-Benzyladenosine Remarkably Increased Its Antiviral Activity and Selectivity // *Molecules*. 2017. Vol. 22. P. 1219.
3. Kozlovskaya L. I. et al. Selective Inhibition of Enterovirus A Species Members' Reproduction by Furano[2, 3-d]pyrimidine Nucleosides Revealed by Antiviral Activity Profiling against (+)ssRNA Viruses // *ChemistrySelect*. 2018. Vol. 3. P. 2321–2325.

## ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ КОРОНАВИРУСОВ У ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ\*

И. О. Колотыгин<sup>1</sup>, Н. А. Дубовицкий<sup>1</sup>, А. М. Логинова<sup>1</sup>,  
А. В. Друзяка<sup>2</sup>, М. Р. Кабилов<sup>3</sup>, А. М. Шестопалов<sup>1</sup>, К. А. Шаршов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск

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

✉ ikolotyginne@list.ru

**Аннотация**

Семейство *Coronaviridae* объединяет вирусы, вызывающие преимущественно кишечные и респираторные инфекции. Известно, что инфекции у птиц вызывают коронавирусы родов *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. В рамках мониторинга вирусных патогенов птиц на территории Западной Сибири было определено наличие коронавируса в клоакальных мазках у птиц семейства *Anatidae* и показано, что все выявленные образцы относятся к роду *Gammacoronavirus*.

Согласно современным представлениям о классификации коронавирусов, в пределах семейства *Coronaviridae* выделяют три подсемейства *Orthocoronavirinae*, *Pitovirinae* и *Letovirinae* [1]. Первое подсемейство делится на четыре рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus* [1]. Вирусы, относящиеся к этим родам, имеют характерный спектр хозяев: вирусы родов *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* поражают млекопитающих, в то время как представителей *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus* находят в основном у птиц. Подавляющее большинство известных коронавирусов птиц относятся к роду *Gammacoronavirus*.

Для исследования разнообразия коронавирусов были взяты образцы клоакальных мазков 170 особей птиц семейства утиные (*Anatidae*) на территории Карасукского района в течение осени 2021 года. Выделение РНК проводили с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах («Медико-биологический Союз», Россия) по прилагаемому протоколу. Далее производили обратную транскрипцию с использованием набора «Обратная транскриптаза RNAscribe RT» («Биолабмикс», Россия). Методом ПЦР при помощи набора «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)» («Биолабмикс», Россия), а также электрофореза ДНК определяли наличие образцов с положительным результатом (коронавирус). Всего мазки были взяты у 170 особей, относящихся к 13 видам семейства *Anatidae*. Среди них были выявлены 18 образцов (10,59 %), содержащих РНК коронавируса. Наибольший процент встречаемости коронавируса приходится на птиц вида *Anas crecca*. Среди 57 особей вида *Anas crecca* обнаружено девять особей, в клоакальных мазках которых присутствует РНК коронавируса. Также она обнаружена у особей видов: *Aythya ferina* ( $n = 1$ ), *Anas strepera* ( $n = 3$ ), *Aythya fuligula* ( $n = 1$ ), *Anas querquedula* ( $n = 1$ ), *Anas acuta* ( $n = 1$ ), *Anas clypeata* ( $n = 2$ ). Поскольку параллельно проводился мониторинг на наличие в мазках РНК вируса гриппа, показано наличие коинфекции вируса гриппа и коронавируса у пяти особей вида *Anas crecca*.

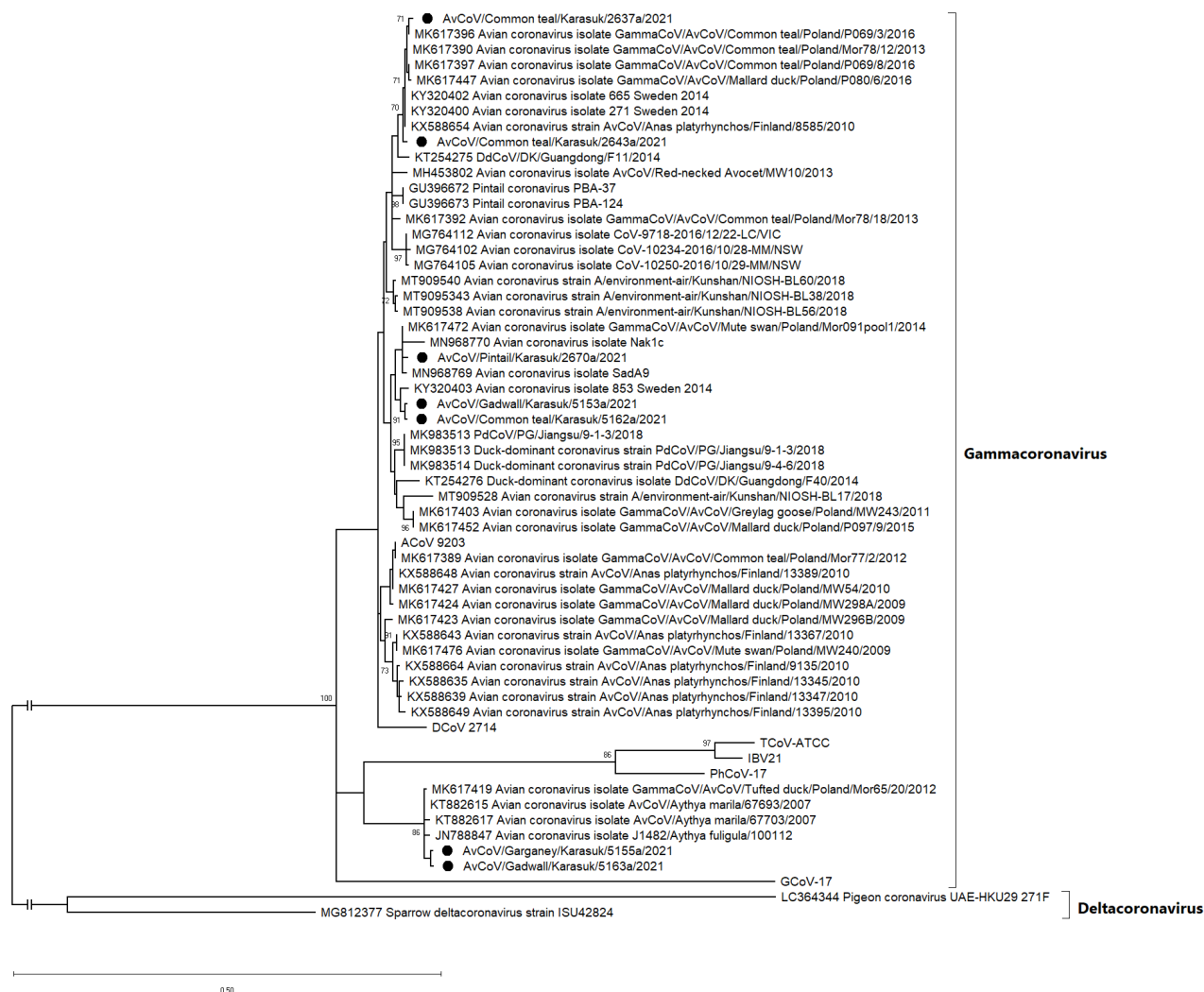
Для семи положительных образцов удалось получить последовательности консервативного участка (457–516 нуклеотидов) гена РНК-зависимой РНК-полимеразы по методу Сэнгера. Филогенетический анализ последовательностей показал, что все семь коронавирусов птиц семейства *Anatidae* относятся к роду *Gammacoronavirus* (см. рисунок).

Поскольку Западная Сибирь является точкой пересечения миграционных путей водоплавающих птиц [2], на этой территории высока вероятность меж- и внутривидовой трансмиссии вирусов между особями, что может способствовать эволюции и распространению вирусов за пределы региона. Таким образом, появляется необходимость изучить вирусное разнообразие, чтобы выявить вирусы, требующие дальнейшего исследования для оценки зоонозных рисков и проведения мероприятий по снижению рисков для сельского хозяйства и здравоохранения.

Данное исследование показывает относительно высокую распространенность коронавируса в популяции водоплавающих птиц семейства *Anatidae* Карасукского района Западной Сибири, что говорит о потребности в более детальном изучении особенностей эволюции и передачи коронавируса у птиц с использованием вирусологических методов, а также с привлечением данных полногеномного секвенирования для уточнения таксономии вирусов и выявления филогенетических паттернов.

\* Работа выполнена в рамках государственного задания Молодежной лаборатории 122012400086-2 и частично поддержана проектом РФФИ 21-54-53031 (сбор образцов, секвенирование и анализ).

© И. О. Колотыгин, Н. А. Дубовицкий, А. М. Логинова, А. В. Друзяка, М. Р. Кабилов, А. М. Шестопалов, К. А. Шаршов, 2022



Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей фрагмента гена РНК-полимеразы коронавирусов птиц родов Gamma- и Deltacoronavirus (метод максимального правдоподобия, модель нуклеотидных замен — TN93, bootstrap-тест — 1 000 итераций). Последовательности, полученные в ходе исследования, отмечены черными кругами

### Литература

1. Lefkowitz E. J. et al. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) // Nucleic Acids Res. Oxford Academic, 2018. Vol. 46. № D1. P. D708–D717.
2. Veen J, Yurlov A. K., Delany S. N., Mihantiev A. I., Selivanova M. A., Boere G. C. An atlas of movements of Southwest Siberian waterbirds. Wageningen (The Netherlands): Wetlands International, 2005.

## АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО КАК ИНГИБИТОРОВ РЕПРОДУКЦИИ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ *IN VITRO*\*

Е. С. Колпакова<sup>1</sup>, Е. В. Карпова<sup>1</sup>, Е. Ю. Шустова<sup>1</sup>, Е. В. Яковчук<sup>1,2</sup>, А. В. Аралов<sup>3</sup>, Л. И. Козловская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ katerina.kolp@gmail.com

### Аннотация

Бенгальский розовый (БР) представляет собой анионный ксантеновый краситель с множеством биологических свойств, включая фотосенсибилизирующие свойства. Окисление липидов фотосенсибилизирующими препаратами может быть перспективным методом подавления репродукции оболочечных вирусов. В этой работе были исследованы противовирусные свойства сложноэфирных производных БР.

Возбудителями многих серьезных инфекционных заболеваний являются оболочечные вирусы, при этом специфические лекарственные препараты существуют лишь для очень небольшого количества представителей этого класса патогенов. Липидная оболочка вириона таких вирусов — многообещающая мишень для разработки противовирусных средств широкого спектра действия. Окисление липидов фотосенсибилизирующими соединениями может нарушать процесс слияния мембран вирусной частицы и клетки-хозяина, необходимого для проникновения вирусного генетического материала в цитоплазму. В связи с этим фотосенсибилизаторы являются перспективными препаратами для исследования. Бенгальский розовый (БР), анионный ксантеновый краситель, обладает фотосенсибилизирующими свойствами, которые ранее были продемонстрированы в рамках антибактериальной фотодинамической терапии. В этом исследовании мы оценили противовирусные свойства производных БР, замещенных по карбоксильной группе алкильными заместителями различной длины (от C4 до C12).

Противовирусную активность оценивали *in vitro* в отношении следующих оболочечных вирусов: вируса Чикунгунья штамм Nic (GenBank ID MN271691-2), SARS-CoV-2 штамм PIK35 (GISAID EPI\_ISL\_428851) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) штамм NL4-3, полученного путем трансфекции клеток плазмидой pNL4-3 (ARP2006, NIBSC, Великобритания). В качестве положительного контроля использовали известные ингибиторы: N<sup>4</sup>-гидроксицитидин (ННС) и азидотимидин (АЗТ). Также для подтверждения механизма действия соединений проводили дополнительный фенотипический скрининг препаратов БР против безоболочечных вирусов рода Enterovirus видов *Enterovirus A* (Coxsackievirus A16, GenBank ID MK704491), *Enterovirus B* (Echovirus 13, GenBank ID MK704490) и *Enterovirus C* (Poliovirus type 1, GenBank ID AY184219).

Производные БР эффективно подавляли репродукцию всех трех оболочечных вирусов *in vitro* со значениями полуингибирующей концентрации меньше 10 мкМ, но не подавляли репродукцию безоболочечных энтеровирусов в максимальной исследованной концентрации 100 мкМ, что косвенно подтверждает механизм действия через вирусную оболочку.

В совокупности с низкой токсичностью показанная активность делает БР и его производные перспективной и оригинальной платформой для разработки лекарственных препаратов против оболочечных вирусов.

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-1049 и 0837-2019-0005).

## ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА CD2V ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА\*

А. Ю. Кольцов, М. М. Сухер, Н. С. Холод, С. А. Крутько, С. В. Белов, Г. С. Кольцова

Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский

✉ kolcov.andrew@gmail.com

### Аннотация

Африканская чума свиней (АЧС) представляет угрозу для свиноводства во всем мире. Прогресс создания безопасных вакцин сдерживается недостатком знаний об антигенах, обеспечивающих защитный иммунитет у свиней. В связи с этим возникает вопрос о создании систем накопления вирусных белков для исследования и доставки их в организм хозяина. В данном исследовании представлено создание экспрессионной системы генов вируса АЧС на основе вируса миксомы кроликов.

Африканская чума свиней — контагиозная вирусная геморрагическая лихорадка домашних и диких свиней. Смертность восприимчивых животных может достигать 100 %. Вирус АЧС — крупный икосаэдрический цитоплазматический вирус, единственный представитель семейства *Asfarviridae*.

Процесс создания безопасных и эффективных вакцин замедлен из-за недостатка знаний о степени разнообразия штаммов вируса АЧС и вирусных антигенах, обеспечивающих защитный иммунитет у свиней. Ранее мы идентифицировали Т-клеточные эпитопы в структуре вирусных белков CD2v и лектин, что указывает на их важную роль в Т-клеточном ответе при АЧС. Кроме того, нами было установлено, что CD2v играет важную роль при индукции защитного иммунитета против заражения гомологичным штаммом.

В настоящее время ведется активный поиск антигенов вируса АЧС, способных обеспечить защиту животных. В связи с этим возникает вопрос о создании систем накопления вирусных белков для исследования и доставки их в организм хозяина. В качестве одного из экспрессионных векторов для наработки белков вируса АЧС нами было предложено использовать вакцинный штамм В82 вируса миксомы кроликов.

Для дальнейшего изучения роли белка CD2v в формировании защитного иммунного ответа, а также сравнительного анализа данного белка у штаммов различных серотипов было принято решение получить и охарактеризовать рекомбинантный вирус миксомы кроликов, экспрессирующий ген *EP402R* вируса АЧС.

Родительский вакцинный штамм В82 вируса миксомы кроликов был получен из ГК микроорганизмов в ФГБНУ ФИЦВиМ и использован для создания рекомбинантного варианта, в геном которого были включены ген *EP402R* вируса АЧС, кодирующий белок CD2v, и репортерный ген *RFP*.

На первоначальном этапе была создана рекомбинационная кассета, которая позволяет ввести в геном вируса миксомы чужеродные гены, кодирующие белки вируса АЧС. В качестве области рекомбинации был выбран межгенный участок M061R/M062R. Ген *M061R* (57,800-58,336 п. о.) кодирует тимидинкиназу, а ген *M062R* (58,409-58,885 п. о.) кодирует фактор видовой специфичности вируса. Для получения рекомбинационной кассеты на первом этапе работы в плазмиду pUC57 были клонированы участки, идентичные фрагментам генов *M061R* и *M062R* вируса миксомы кроликов, которые являются «плечами рекомбинации». Между этими «плечами» клонировали ген *EP402R* вируса АЧС и ген репортерного белка *RFP* под контролем промоторов P7.5 и P11 осповакцины соответственно. Эта кассета была использована для получения рекомбинантного вируса миксомы кроликов. Клетки RK-13 инфицировали родительским вирусом и трансфицировали «рекомбинационной кассетой». Рекомбинантный вирус селекционировали по репортерной флюоресценции *RFP* методами предельных разведений и «бляшкообразования» в культуре клеток RK-13. Чистоту полученного вируса подтверждали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических праймеров. Правильность прохождения гомологичной рекомбинации и отсутствие нуклеотидных замен в области рекомбинации были подтверждены нуклеотидным секвенированием.

Рекомбинантный вирус эффективно реплицировался в культуре клеток RK-13, при этом кинетика репликации *in vitro* не отличалась от родительского вируса. При добавлении к культуре клеток эритроцитов свиней репликация рекомбинантного вируса миксомы сопровождалась развитием феномена гемадсорбции, что подтверждало эффективную экспрессию гена *EP402R* вируса АЧС. Кроме того, экспрессия чужеродного гена при инфицировании рекомбинантным вирусом была подтверждена методом вестерн-блота и иммунофлюоресцентного анализа.

Полученный вирус будет в дальнейшем использован для проверки его иммуногенности и возможности использования в качестве вектора доставки антигенов в организм кроликов и свиней.

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-76-10030).



## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МОНОЦИТОВ ИММУНИЗИРОВАННЫХ СВИНЕЙ ПРИ ГОМОЛОГИЧНОМ ИЛИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ\*

Г. С. Кольцова, А. Ю. Кольцов, Н. С. Холод

Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский

✉ burmakinags@gmail.com

### Аннотация

Африканская чума свиней (АЧС) представляет собой серьезную угрозу для свиноводства во всем мире. В данном исследовании мы провели сравнительный анализ транскриптома для выявления различий в экспрессии генов мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), выделенных от свиней, иммунизированных аттенуированным штаммом вируса КК262, а затем инфицированных *in vitro* вирулентным гомологичным штаммом К49 или вирулентным гетерологичным штаммом М78.

Африканская чума свиней — контагиозная вирусная геморрагическая болезнь домашних и диких свиней с летальностью до 100 %, сопровождающаяся лихорадкой, цианозом кожи, диареей, судорогами. Вирус АЧС — крупный икосаэдрический цитоплазматический вирус семейства *Asfarviridae*. Распространение вируса АЧС в популяциях домашних свиней и диких кабанов приводит к существенным экологическим, экономическим и социальным последствиям.

Несмотря на интенсивные исследования, молекулярные механизмы патогенеза и протективный иммунитет к АЧС остаются недостаточно изученными. Также до сих пор неизвестно, коррелируют ли уровни цитокинов/хемокинов с защитой свиней от АЧС. Кроме того, есть вероятность, что не только цитокины и хемокины участвуют в молекулярных механизмах формирования защитного иммунного ответа или, наоборот, развития патологических процессов. Понимание этих механизмов имеет решающее значение для разработки вакцин против АЧС.

Целью данного исследования была характеристика уровня экспрессии генов мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных от свиней, иммунизированных аттенуированным штаммом вируса КК262 (генотип I, серогруппа 2), а затем инфицированных *in vitro* вирулентным гомологичным штаммом К49 (генотип I, серогруппа 2) или гетерологичным штаммом М78 (генотип V, серогруппа 3).

Мононуклеарные клетки периферической крови получали от животных, иммунизированных вирусом АЧС штаммом КК262 в дозе  $10^6$  TCID<sub>50</sub> дважды с 21-дневным интервалом. РВМС выделяли из дефибринированной крови с использованием Lymphocyte separation media (Gibco). Клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 30 % плазмы, 10 % FBS (Gibco). Клетки ( $1 \times 10^6$  клеток/лунку) высевали в 48-луночные планшеты и инкубировали 2 ч при 37 °С с 5 % CO<sub>2</sub>. Затем клетки инокулировали двумя различными вирулентными вирусами с множественностью заражения 1 (MOI = 1). Через пять часов после инокуляции вирусом РВМС однократно промывали стерильным PBS и использовали для выделения тотальной РНК. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента Trisol LS (Invitrogen) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование проводили на системе HiSeq 1500 с длиной считывания 50 п. н. Для каждого образца было сгенерировано не менее 10 млн прочтений. Прочтения были сопоставлены с геномом свиньи с использованием выравнивателя STAR, а дифференциально экспрессированные транскрипты были подсчитаны с помощью DESeq2.0.

Мы обнаружили, что сверхэкспрессия IFN- $\gamma$  была обнаружена только в клетках, инфицированных М78, хотя экспрессия интерферон-стимулированных генов была увеличена в обоих типах клеток. Кроме того, в РВМС, инфицированных гетерологичным штаммом М78, была обнаружена активация провоспалительных цитокинов и хемокинов (в отличие от клеток, инфицированных К49). Эти данные могут свидетельствовать о начале раннего иммунного ответа в клетках, инфицированных гетерологичным, но не гомологичным штаммом.

Анализ транскриптома выявил подавление генов, участвующих в эндоцитозе и фагоцитозе, в клетках, инфицированных штаммом К49, но не в РВМС, инфицированных М78. Напротив, мы обнаружили активацию генов стрессового ответа эндоплазматического ретикулума в клетках, инфицированных гомологичным штаммом, но не в клетках, инфицированных гетерологичным штаммом.

Это исследование является первой попыткой определить различия в ответе при гомологичной и гетерологичной инфекции АЧС на клеточном уровне. Наши результаты показали, что не только гены иммунного ответа, но и гены, участвующие в эндоцитозе и клеточном стрессовом ответе, могут оказаться важны для формирования перекрестного протективного иммунитета. Эти данные могут быть полезны для разработки вакцин или тестирования вакцин-кандидатов.

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-76-10030).

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ РУКОКРЫЛЫХ, ОБИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД С 2015 ПО 2021 ГГ.

Е. В. Корнеев<sup>1</sup>, А. Е. Самойлов<sup>1</sup>, И. В. Артюшин<sup>2</sup>,  
А. П. Юзефович<sup>2</sup>, А. С. Гладких<sup>3</sup>, В. Г. Дедков<sup>3</sup>, А. С. Сперанская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

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

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

✉ [lennatta@yandex.ru](mailto:lennatta@yandex.ru)

### Аннотация

Рукокрылые являются природным резервуаром многих вирусов. В связи с распространением вызываемых коронавирусами заболеваний, таких как тяжелый острый респираторный синдром, ближневосточный респираторный синдром, COVID-19, мониторинг вирусной популяции в летучих мышах представляет большой интерес. В нашем исследовании мы провели мониторинг вирусных популяций в рукокрылых, обитающих на территории центральных и южных регионов Российской Федерации, в период с 2015 по 2021 гг.

Летучие мыши являются резервуарами различных вирусов, способных вызывать заболевания у человека. Среди них лиссавирусы, Хендра, Нипах, Марбург и, возможно, вирусы Эбола. Альфа-коронавирусы (HCoV-229E, HCoV-NL63), а также бета-коронавирусы (HCoV-NKUI, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2) предположительно были переданы человеку напрямую от летучих мышей или через промежуточного хозяина. В период 2015–2021 гг. были собраны фекалии летучих мышей различных родов, обитающих на территории Московской области и южных регионов РФ. По результатам генетического анализа удалось показать, что на территории России в природных резервуарах циркулируют MERS-подобные бетакоронавирусы. Компьютерное моделирование (докинг) связывания S-белка нового MERS-подобного коронавируса с рецептором DPP4 человека, европейского ежа и летучей мыши позволяет предположить, что промежуточным хозяином вируса могут быть ежи. Также были определены последовательности геномов двух новых альфакоронавирусов из летучих мышей, пойманных в Звенигородском районе Московской области.

Анализируя различные виды рукокрылых, мы продемонстрировали, что одно животное может быть носителем одновременно нескольких коронавирусов (альфакоронавирусов и бетакоронавирусов). Генетически близкие альфакоронавирусы были выявлены у рукокрылых вида *P. kuhlii*, пойманных в близко расположенных географических локациях (в Московской области) в 2015 и 2021 годах. Этот факт свидетельствует о длительной циркуляции в природе, как минимум, нескольких штаммов альфакоронавирусов. Кроме полных геномов альфакоронавирусов и бетакоронавирусов в рукокрылых (*Nyctalus noctula*), обитающих на территории Московской области, обнаружен полный геном мастаденовируса.

Таким образом, наши данные вносят вклад в изучение вирусных популяций рукокрылых, а также возможной межвидовой передачи вирусов как между различными видами рукокрылых, так и от летучих мышей животным и человеку напрямую или посредством промежуточных хозяев.

## МОРСКАЯ СВИНКА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА COVID-19

Г. А. Кудров, А. В. Шиповалов, А. А. Томилов, О. С. Таранов, Е. К. Ивлева, С. А. Боднев,  
Н. Д. Болдырев, А. В. Зайковская, С. А. Пьянков, И. С. Шульгина, О. В. Пьянков, Р. А. Максюттов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ kudrov\_ga@vector.nsc.ru

### Аннотация

В условиях пандемии лабораторные животные играют важную роль в получении знаний о патогенезе заболевания и, как следствие, в разработке средств, направленных на борьбу с ним. Золотистый хомячок, приматы (кроме человека), хорьки, трансгенные мыши уже зарекомендовали себя как модельные животные во множестве исследований SARS-CoV-2. Обладая собственными сильными и слабыми сторонами, данные модели схожи в том, что представляют инфекцию SARS-CoV-2 легкой и средней степени тяжести.

Цель данной работы — изучение инфекции SARS-CoV-2 тяжелой степени тяжести с гистологическим подтверждением тяжелых постинфекционных изменений в тканях легких на модели морской свинки.

Высокая заболеваемость и смертность от COVID-19 сделали разработку вакцин и противовирусных препаратов приоритетной задачей. Благодаря быстрому созданию вакцин удалось значительно снизить заболеваемость и смертность от данной инфекции. С возникновением новых вызывающих беспокойство вариантов (*variants of concern*, VOC) вируса SARS-CoV-2 все чаще публикуются исследования, описывающие снижение нейтрализующей активности антител после вакцинации и заболевания в отношении новых вариантов. Разработка средств лечения, профилактики и оценка эффективности применения уже существующих методов против новых VOC вируса SARS-CoV-2 до сих пор актуальна.

На сегодняшний день исследования SARS-CoV-2 инфекции *in vivo* на модельных животных ограничены из-за отсутствия тяжелой формы заболевания и летальности. Вопрос качественного моделирования тяжелого клинического течения и патологии, сопоставимой с тяжелой формой COVID-19 у человека, остается открытым.

Появление сообщений об экспериментально доказанной патогенности некоторых VOC для ранее невосприимчивых видов вернуло интерес к поиску новых модельных животных для изучения инфекции SARS-CoV-2.

Морская свинка, будучи моделью для исследования множества инфекционных заболеваний человека, в отношении исходного штамма Wuhan-hu-1 вируса SARS-CoV-2 не показала развития инфекционного процесса и применялась только для доклинической оценки безопасности разрабатываемых средств борьбы с COVID-19. Во многих исследованиях других вирусных агентов не раз отмечалось сходство иммунного ответа морских свинок и человека. Мы предположили, что при прохождении ранее непреодолимого видового барьера благодаря заменам в рецептор-связывающем домене (*receptor binding domain*, RBD) VOC вируса SARS-CoV-2 у морских свинок (из-за схожести иммунного ответа с человеческим) вызовет патологическую иммунную реакцию в виде цитокинового шторма. Такая реакция характерна для тяжелого течения COVID-19 и летального исхода, но до сих пор она не была показана в животной модели.

Для исследования был выбран штамм, выделенный на территории РФ в конце 2020 г., относящийся к варианту V.1.1.7 (VOC альфа) вируса SARS-CoV-2. Имея значимую замену N501Y в RBD, данный вариант показал инфекционность на ранее невосприимчивых к инфекции мышах BALB/c.

После интраназального заражения дозой 4 lg ЦПД<sub>50</sub> морских свинок были зафиксированы клинические изменения: потеря веса (до 7,9 %) и повышение температуры тела от 38,6 до 40,3 °С. Репликация вируса в тканях носовой полости подтверждена в 1–5 сутки в образцах назальных смывов методом ПЦР-РВ. Полная элиминация вируса в слизистой носа зафиксирована на седьмые сутки. Самки имели большую резистентность к инфекции, чем самцы, демонстрируя значимо меньшую вирусную нагрузку на 3 и 5-е сутки ( $p \leq 0,05$ ) и вдвое больший коэффициент позитивности в ИФА на антитела к SARS-CoV-2. Нейтрализующая активность сывороток крови, отобранных на 15-е сутки, не имела половых различий, титр на клетках Vero E6 составил 1:100.

В легких на 15-е сутки РНК вируса не выявлено. На окрашенных гематоксилин-эозином срезах обнаружена тотальная инфильтрация с множественными очагами тромбозов, что соответствует клинике респираторного дистресс-синдрома, признаки которого описаны в образцах аутопсийного материала легких пациентов с летальным исходом вследствие COVID-19.

Отсутствие РНК SARS-CoV-2 в легких на фоне тяжелой легочной патологии говорит об иммунной этиологии легочного повреждения у данного вида животных. Использование морской свинки в качестве модели SARS-CoV-2 инфекции в перспективе может отвечать задачам исследований, направленных на изучение патогенеза иммунного повреждения и способов его лечения.

## PHYLOGENETIC ANALYSIS OF CHROMOSOMALLY INTEGRATED HUMAN HERPES VIRUSES TYPES 6A AND 6B IN RUSSIA

A. V. Kusakin<sup>1,2</sup>, O. V. Goleva<sup>1</sup>, L. G. Danilov<sup>3,4</sup>, V. V. Tsai<sup>1</sup>, R. S. Kalinin<sup>1</sup>, O. S. Glotov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PRCCID, Saint Petersburg

<sup>2</sup>ITMO University, Saint Petersburg

<sup>3</sup>Saint Petersburg State University

<sup>4</sup>CerbaLab Ltd, Saint Petersburg

✉ kusakin@scamt-itmo.ru

### Abstract

Human herpes viruses type 6 are widely spread in the population. They have been found to be able to switch to the chromosomally integrated form of HHV-6 (ciHHV-6). It can be inherited and/or reactivated causing recurrent disease. Therefore, it is necessary to identify and observe people with ciHHV-6. We performed a phylogenetic analysis to establish the origin and search for the chromosomal integration locus in 4 HHV-6 registered in Russia.

HHV-6A/6B, along with HHV-7, forms the genus *Roseolovirus*, subfamily *Betaherpesvirinae*, family *Herpesviridae*. HHV-6 is widespread in human population. For example, more than 90 % of the population is infected with HHV-6B during the first three years of life. Less is known about the epidemiology of HHV-6A, but it has been shown that introduction of this infection occurs later in life and is asymptomatic.

Members of the genus *Roseolovirus* cause diseases such as sudden exanthema, fever in children with seizure syndrome, infectious mononucleosis, etc. HHV-6A/B has been linked to a number of serious diseases in immunocompromised people including ataxia, mild dementia, encephalitis, etc.

HHV-6A and 6B proved to exist latently as a provirus. Chromosomally integrated HHV-6A/6B (ciHHV-6A/6B) has been found in 9q, 10q, 13q, 17p, 18q, 19q and 22q [1]. This kind of virus can be inherited (iciHHV-6). ciHHV-6 is associated with such diseases as angina pectoris, unexplained infertility and possibly an increased risk of pre-eclampsia [2].

The mechanisms of integration of the viral genome into the host cell's DNA and the consequences for the organism are not fully understood. It has been shown that an integrated virus can reactivate causing a recurrent disease. Also, the integrated virus can be transmitted from mother to child as an active circulating form [3].

More than 180 ciHHV-6 assembled genomes are available in the NCBI public database. Most of these integration cases are described in the literature.

Currently, there is a lack of data on integrated forms of HHV-6 in Russia. There are three cases of ciHHV-6 registered in Moscow, two of them are 6A and one is 6B. Assemblies of these genomes are also available from NCBI (NCBI IDs: MK630133, MK630134 and MN242397). We detected and sequenced a new case of ciHHV-6A registered in the Leningrad Region.

In order to establish the origin and integration locus of all 4 HHV-6 strains, a phylogenetic analysis was performed.

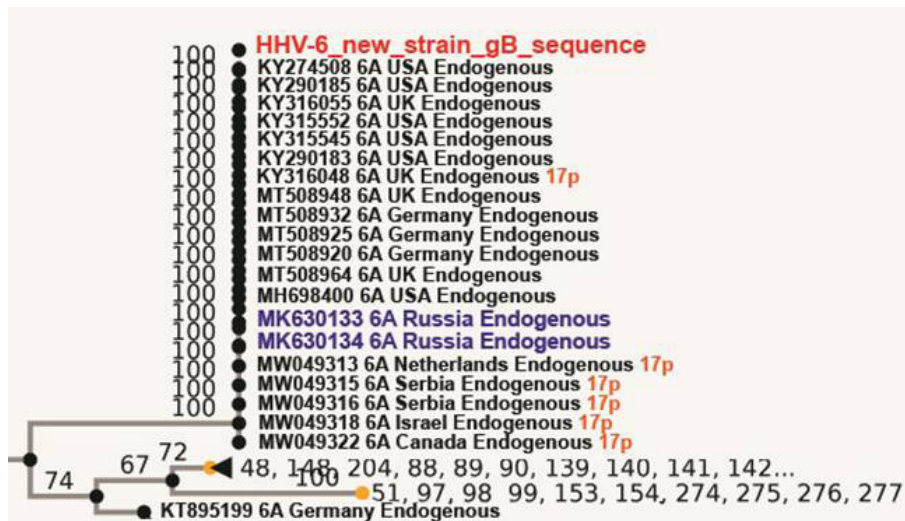
The nucleotide sequences of the HHV-6A gB (U39) and HHV-6A gH (U48) genes were used for phylogenetic analysis. All genes from the 270 HHV-6 assemblies available from the NCBI database were included into the analysis. The MAFFT algorithm v7.505 was used for the sequence alignment [4]. The resulting alignments were then arranged to build a tree using the Neighbor—Joining method (Jukes—Cantor, Bootstrap resampling = 100) [5].

The results of phylogenetic analysis showed a strict separation of HHV-6A and HHV-6B into two separate branches. The ciHHV-6A found in Russia belongs to a clade of European and North American carriers in which the virus is integrated into the short arm of a chromosome 17 (17p) (see Fig.). The events of HHV-6A integration into human chromosome 17p are estimated to have occurred 23–105 thousands years ago [3].

There is not enough data to suggest an HHV-6B integration site, but it also belongs to the European–North American clade.

These results provide insight into the integration locus of the three ciHHV-6A registered in Russia avoiding the expensive and time-consuming FISH method. It was also established that all four ciHHV-6 found in Moscow and the Leningrad region belong to the European–North American clade.

Determination of the ciHHV-6A/6B integration locus in a patient may serve as a long-term predictor of the risk of somatic diseases associated with these viruses.



Phylogeny of a new HHV-6 strain based on the gB protein. The position of the virus from our case is highlighted in red on the tree. Two strains of the virus from Moscow are marked with blue

## References

1. Collin V., Flamand L. HHV-6A/B integration and the pathogenesis associated with the reactivation of chromosomally integrated HHV-6A/B // *Viruses* 9.7. 2017. P. 160.
2. Wood M. L., Royle N. J. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: models of viral genome release from the telomere and impacts on human health // *Viruses* 9.7. 2017. P. 184.
3. M. L. Wood et al. Variation in human herpesvirus 6B telomeric integration, excision, and transmission between tissues and individuals // *Elife* 10. 2021. e70452.
4. Rozewicki J. et al. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment // *Nucleic acids research*. 2019. Vol. 47. W1: W5–W10.
5. Robinson O., Dylus D., Dessimoz C. Phylo. io: interactive viewing and comparison of large phylogenetic trees on the web // *Molecular biology and evolution*. 2016. No. 8(33). P. 2163–2166.

## НОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ВАРИАНТ CRF133\_A6/B ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННЫЙ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ\*

Л. В. Максименко<sup>1</sup>, М. В. Сивай<sup>1</sup>, А. В. Тотменин<sup>1</sup>, А. Н. Швалов<sup>1</sup>,  
С. Е. Скударнов<sup>2</sup>, Т. С. Остапова<sup>2</sup>, С. В. Яценко<sup>2</sup>, Н. М. Гашникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД

✉ maksimenko\_lv@vector.nsc.ru

### Аннотация

На территории Красноярского края доминирует распространение под-субтипа А6 ВИЧ-1. Мониторинг ВИЧ-1 в этом регионе показал, что характер эпидемии меняется: с каждым годом регистрируется все больше новых URFs ВИЧ-1 и растет их вклад в развитие эпидемического процесса. Некоторые возникшие URF ВИЧ-1 начинают активно распространяться. В данной работе представлен анализ впервые описанных геновариантов ВИЧ-1, имеющих одинаковую модель рекомбинации.

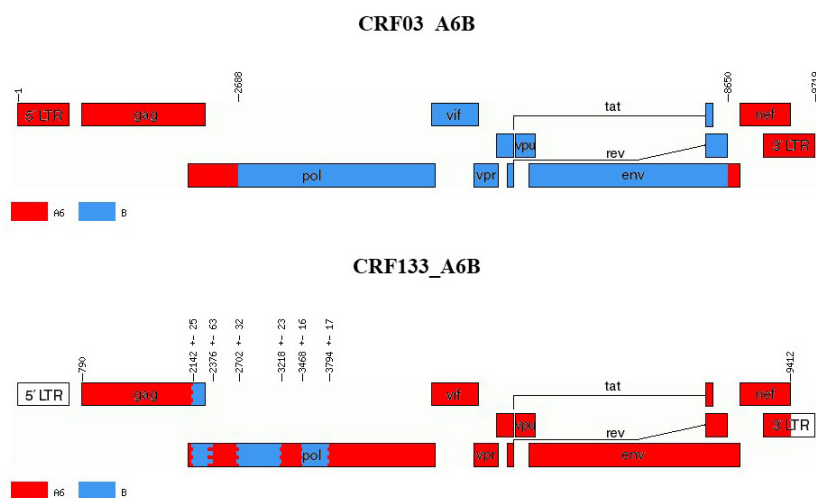
Для оценки эпидемии ВИЧ-инфекции необходимо отслеживать динамику распространения различных геновариантов вируса. Увеличение вариабельности ВИЧ-1 за счет возникновения и распространения новых рекомбинантных форм может влиять на качество диагностики и эффективность лечения заболевания.

Цель данной работы заключается в проведении углубленного анализа структуры генома новой рекомбинантной формы ВИЧ-1 (CRF133\_A6/B), выявленной и распространяющейся на территории Красноярского края.

### Результаты

При проведении мониторинга ВИЧ-1 на территории Красноярского края в 2017–2022 гг. у восьми пациентов был выявлен ВИЧ-1, которому впоследствии было присвоено название CRF133\_A6B, обладающий идентичной структурой генома и возникший в результате рекомбинации под-субтипа А6 и субтипа В. Данная работа посвящена анализу полногеномных нуклеотидных последовательностей выявленных вариантов ВИЧ-1. Нуклеотидные последовательности были получены с использованием платформы Illumina MiSeq и включают все области генома, кроме участка LTR (длинных концевых повторов) с 790 по 9417 п. н., HXB2 (GenBank: #K03455).

Анализ, проведенный для CRF133\_A6/B ВИЧ-1 с использованием программного обеспечения jPHMM (<http://jphmm.gobics.de>), показал, что в геноме этих вирусов, представленном последовательностью субтипа А6, присутствуют три встройки последовательностей субтипа В: в положении с 2702+–32 до 3218+–23, которая по данным литературы является «горячей» точкой рекомбинации, а также в положениях с 2142+–25 до 2376+–63 и 3468+–14 до 3794+–17, которые не относятся к «горячим» точкам (см. рисунок). Анализ филогенетики, проведенный по области гена *pol*, показал, что данная рекомбинантная форма возникла в 1990-х — начале 2000-х годов.



Сравнение геномов CRF03\_A6B и CRF133\_A6B ВИЧ-1

\* Работа выполнена в рамках Государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора № 5/21.

**Выводы**

Увеличение гетерогенности вируса и выявление разнообразных URF, а также выявление новой CRF133\_А6В ВИЧ-1 в Красноярском крае может говорить о широком распространении практик рискованного поведения, что приводит к случаям повторного заражения ВИЧ-1. Наблюдаемый существенный вклад рекомбинационной изменчивости ВИЧ-1 в изменение генетических характеристик современных циркулирующих на различных территориях России вирусов указывает на необходимость продолжения мониторинга за популяцией ВИЧ-1.

## ФОРМИРОВАНИЕ IGG-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ОТВЕТА В-КЛЕТКАМИ МЕДИАСТИНАЛЬНЫХ ЛИМФОУЗЛОВ КАК ОСНОВНОЙ ЗАЩИТНЫЙ ФАКТОР ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ M2E

Д. А. Меженская, И. Н. Исакова-Сивак, Л. Г. Руденко

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

✉ dasmez@iemspb.ru

### Аннотация

При изучении механизмов формирования иммунного ответа после иммунизации прототипом универсальной живой гриппозной вакцины на основе M2e было показано, что наиболее вероятным механизмом защиты иммунизированных животных от заражения гетерологичным вирусом гриппа является секреция анти-M2e антител В-клетками медиастинальных лимфатических узлов в короткие сроки после экспериментального заражения.

Грипп — инфекционное респираторное заболевание, и вакцинация является наиболее эффективной мерой по борьбе с его распространением. Из-за высокой изменчивости вирусов гриппа по всему миру ведутся разработки универсальных гриппозных вакцин, которые бы обладали более широким и продолжительным спектром действия по сравнению с сезонными вакцинами. Основная стратегия создания таких вакцин — усиление иммуногенности консервативных фрагментов вирусов гриппа, которые в норме являются слабыми иммуногенами [1].

Ранее нами был разработан прототип универсальной живой гриппозной вакцины на основе отечественного донора аттенуации — А/Ленинград/134/17/57, который имел поверхностные гены от сезонного штамма А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2) [2]. Также такой прототип имел дополнительную вставку, состоящую из четырех фрагментов консервативного внеклеточного фрагмента M2 (M2e) в молекуле гемагглютинаина (HA).

Для изучения механизмов формирования иммунного ответа был проведен опыт на модели хорьков. Для этого животных дважды интраназально иммунизировали вакцинными штаммами H3N2 или H3N2 + 4M2e с интервалом в три недели, тогда как группа плацебо получала фосфатно-солевой раствор (PBS). Через три недели после второй иммунизации животные всех групп были заражены высокой дозой гетерологичного вируса гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1pdm09), и на пятый день после заражения у животных осуществлялся сбор легких для оценки уровня репликации патогена, а также сбор медиастинальных лимфатических узлов (МЛУ), расположенных в легких.

Выделенные из МЛУ клетки оценивались по их способности продуцировать антитела с дополнительной стимуляцией. Определение уровня антител после стимуляции показало формирование равных уровней антител к цельному вирусу H3N2, тогда как при стимуляции рекомбинантным белком были обнаружены достоверно более высокие уровни антител у животных, получавших рекомбинантную вакцину H3N2 + 4M2e.

Для поиска взаимосвязи между уровнем антител, стимулированных клетками МЛУ, и уровнем продемонстрированной защиты от патогенного вируса, который определялся в результате титрования тканей легких с использованием куриных эмбрионов, был проведен корреляционный анализ. В результате показана достоверная обратная взаимосвязь общего количества M2e-специфических IgG антител и уровнем репликации патогена в легких. Однако никакой достоверной связи для анти-H3N2 антител обнаружено не было.

Таким образом, можно предположить, что именно вклад анти-M2e антител влияет на усиление защиты рекомбинантными вакцинами, содержащими дополнительные эпитопы M2e, от гетерологичного челлендж вируса.

### Литература

1. Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenkaya D., Matyushenko V., Prokopenko P., Sychev I., Wong P. F., Rudenko L. Influenza vaccine: progress in a vaccine that elicits a broad immune response // *Expert Review of Vaccines*. 2021. Vol. 20. No. 9. P. 1097–1112.
2. Kotomina T., Isakova-Sivak I., Kim K. H., Park B. R., Jung Y. J., Lee Y., Mezhenkaya D., Matyushenko V., Kang S. M., Rudenko L. Generation and Characterization of Universal Live-Attenuated Influenza Vaccine Candidates Containing Multiple M2e Epitopes // *Vaccines (Basel)*. 2020. Vol. 8. No. 4.



## ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВИРУСА SARS-COV-2 СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ТЕРПЕНОИДОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ

Е. Д. Мордвинова<sup>1,2</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>2</sup>, О. И. Яровая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

✉ [mordvinova97@mail.ru](mailto:mordvinova97@mail.ru)

### Аннотация

В ходе работы был проведен скрининг около 60 производных терпеноидов с использованием псевдировусных частиц, несущих поверхностный белок SARS-CoV-2. В результате проделанной работы обнаружено, что среди представленных образцов только сложнэфирные производные борнеола проявили ингибирующую активность.

Несмотря на успехи в разработке вакцин против SARS-CoV-2 и их внедрение, задача по поиску эффективных терапевтических агентов остается актуальной. Этапы прикрепления и проникновения вируса представляют особый интерес среди возможных терапевтических мишеней в жизненном цикле вирусов, так как они являются первыми этапами в цикле репликации и происходят в относительно доступном внеклеточном месте. Поверхностный белок S SARS-CoV-2 ответственен за связывание с клеточным рецептором — ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) — и проникновение вируса в клетку-хозяина. Ингибиторы поверхностного белка SARS-CoV-2 потенциально могут стать средствами для лечения COVID-19.

Цель данной работы заключается в поиске ингибитора поверхностного белка SARS-CoV-2 среди производных терпеноидов и красителей с использованием псевдировусных частиц.

В данной работе было проведено скрининг производных терпеноидов: камфоры, борнеола, тритерпенов, адамантана. Данные соединения были синтезированы в лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН. Для всех исследуемых соединений была определена цитотоксическая концентрация ( $CC_{50}$ ) в отношении клеток НЕК293Т и полуингибирующая концентрация ( $IC_{50}$ ). Из всех соединений, только сложнэфирные производные борнеола проявили противовирусную активность с  $IC_{50}$  от 15 до 30 мкМ.

Взаимодействия между ACE2 и S-белком SARS-CoV-2 являются перспективной мишенью для разработки белок-белкового ингибитора. В конкурентном ИФА среди терпеноидов не было выявлено ингибитора взаимодействия RBD-ACE2. Для поиска такого ингибитора лабораторией красителей РХТУ была протестирована новая библиотека соединений — органических красителей. Ксантеновые красители (эритрозин, эозин Н, эозин) продемонстрировали активность  $IC_{50}$  от 8.5 до 35 мкМ.

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РАЗВИТИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ *IN VITRO* НА ОСНОВЕ ИНФЕКЦИОННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНА ВИЧ И МОДИФИЦИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МТ-4/eGFP\*

А. А. Нефедова<sup>1</sup>, К. А. Елфимов<sup>1,2</sup>, Н. М. Гашникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово  
<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ nefedova\_aa@vector.nsc.ru

### Аннотация

Создана модельная система, состоящая из инфекционного молекулярного клона ВИЧ-1 и клеточной культуры МТ-4/eGFP. Показано, что сигнал от флуоресцентных меток модельной системы позволяет изучить развитие инфицирование клеток ВИЧ *in vitro*, оценить их жизнеспособность без проведения дополнительных тестов. Показано, что полученная модельная система является перспективным объектом исследования кандидатных лекарственных препаратов для лечения ВИЧ-инфекции.

Актуальность поиска новых подходов к терапии ВИЧ-инфекции ведет к необходимости создания моделей *in vitro* для оценки эффективности подавления репликации ВИЧ и токсичности лекарственных препаратов. В работе исследуется возможность мониторинга репликации ВИЧ на уровне единичных клеток с помощью комплекса из созданного инфекционного молекулярного клона (ИМК) ВИЧ-1, pSG3.1\_DsRed-Express, и модифицированной культуры клеток МТ-4/eGFP.

В последовательность ИМК pSG3.1, полученного по программе NIH AIDS Reagent Program, был введен ген *DsRed-Express*, отражающий экспрессию *Nef* ВИЧ-1 благодаря своему продукту — флуоресцентному белку DsRed-Express. ИМК культивировали на модифицированной клеточной культуре МТ-4, экспрессирующей eGFP, который являлся маркером жизнеспособности клеток. Для проверки репликации ВИЧ в клеточной популяции проводили окраску антителами к p24 ВИЧ (FITC Anti-HIV1 p24 (Abcam)). Отбор проб и их анализ производился в день заражения культуры клеток (0-е сутки) и далее на 4, 5 и 6-е сутки культивирования ВИЧ. Измерение сигнала от меток проводили на проточном цитометре с визуализацией Amnis FlowSight: возбуждение флуоресценции лазером с длиной волны в 488 нм мощностью 60 мВт; детекция в синем и желтом канале флуоресценции.

В день заражения клеточной культуры ВИЧ-1 (0-е сутки) количество живых клеток составляло 68,9 % у инфицированной ИМК ВИЧ-1 культуры и 89,9 % у контрольной. Сигнал от DsRed-Express, маркирующий экспрессию *Nef* ВИЧ-1, обнаруживался у 10,4 % клеток с ИМК ВИЧ-1. p24 ВИЧ находился в 5,4 % клеток зараженной культуры.

На 4-е сутки культивирования количество живых клеток снизилось до 53,5 % в образце с ИМК ВИЧ-1 и 61,3 % в контроле. Сигнал от DsRed-Express имелся у 19,6 % клеточной популяции, а белок p24 ВИЧ содержали 29,4 % клеток.

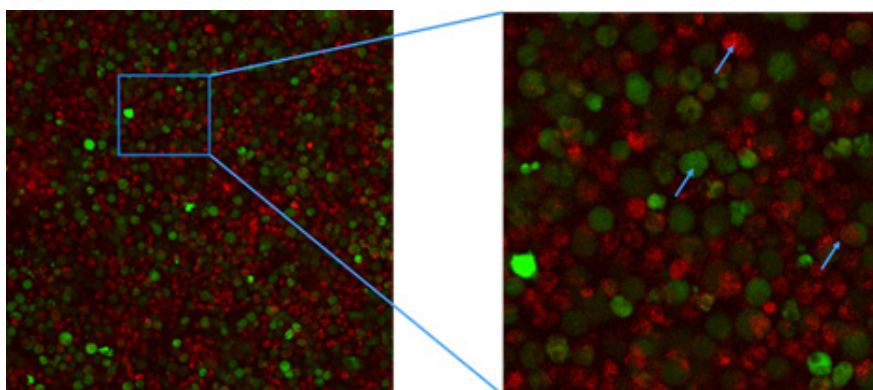


Рис. 1. Конфокальное изображение клеток МТ-4/eGFP, инфицированных ИМК SG3.1\_DsRed-Express ВИЧ-1, увеличение  $\times 20$  и  $\times 40$ . Красный сигнал — DsRed-Express, зеленый сигнал — eGFP. Стрелками указаны клетки с разным содержанием двух флуорохромов

\* Исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

На 5-е сутки произошло снижение количества жизнеспособных клеток до 31,1 % в инфицированной популяции МТ-4, при этом в контрольной культуре количество живых клеток выросло за счет деления до 80,3 %. DsRed-Express — а значит и *Nef* ВИЧ-1 — экспрессировался у 24,8 % клеток.

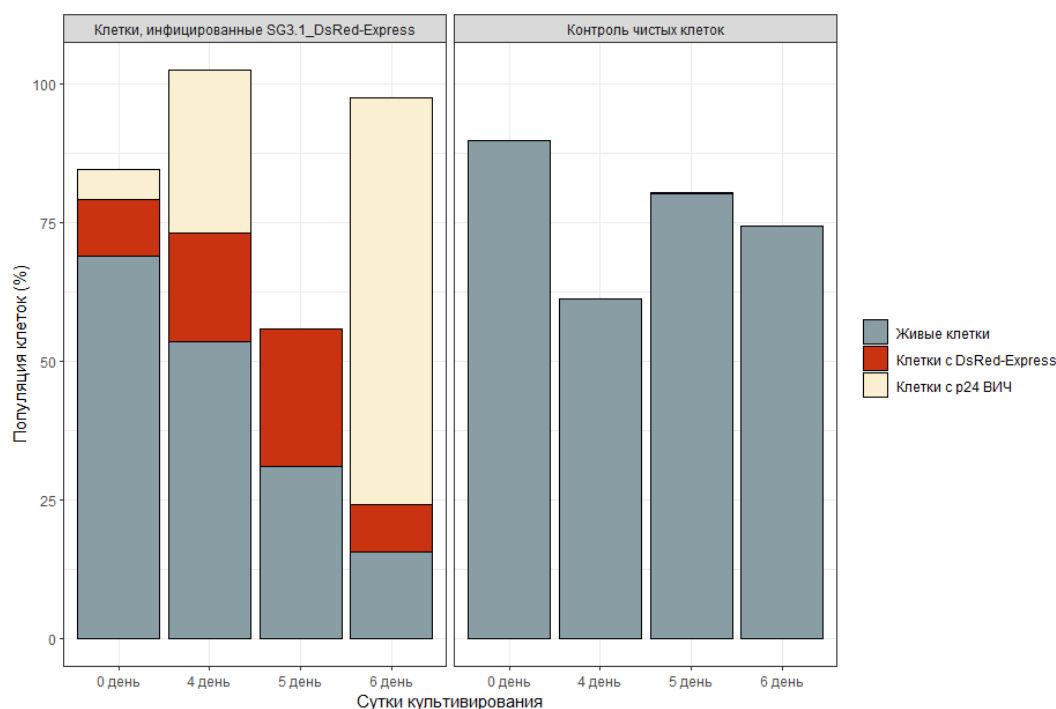


Рис. 2. Клеточные субпопуляции в культуре МТ-4/eGFP в разные дни культивирования

На 6-е сутки эксперимента в образце с ВИЧ-инфекцией осталось 15,5 % живых клеток, в контроле — 74,4 %. Сигнал от DsRed-Express имелся у 8,6 % клеток, а от p24 ВИЧ уже у 73,6 %. ВИЧ-1 практически исчерпал клеточный резерв, и темп инфицирования клеток снизился, так как количество клеток с экспрессией *Nef* упало по сравнению с 5-ми сутками культивирования — с 24,8 % до 8,5 %.

В ходе эксперимента показано, что модельная система МТ-4/eGFP с ИМК pSG3.1\_DsRed-Express ВИЧ-1 позволяет установить темпы развития ВИЧ-инфекции и цитопатическое действие ВИЧ в одном образце за счет стабильного уровня флуоресценции DsRed-Express, маркирующего экспрессию *Nef*, и eGFP как маркера жизнеспособности клеток.

Модель является перспективной для проверки лекарственных препаратов, в том числе с неустановленным механизмом действия: в таком случае наличие или отсутствие раннего белка ВИЧ *Nef* может свидетельствовать о стадии жизненного цикла ВИЧ, во время которого происходит подавление его репродукции. Также уровень экспрессии eGFP от культуры клеток будет демонстрировать изменения трансляционных процессов клетки в целом, отражая влияние как ВИЧ-инфекции, так и воздействия терапевтических препаратов.

## КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G КРОВИ ДОНОРОВ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ SPUTNIK V\*

М. К. Онвумере<sup>1</sup>, А. С. Толмачева<sup>2</sup>, А. М. Тимофеева<sup>2</sup>, С. Е. Седых<sup>1,2</sup>, Г. А. Невинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ m.onvumere@g.nsu.ru

### Аннотация

В работе исследована каталазная активность поликлональных IgG плазмы крови здоровых доноров, а также пациентов, переболевших COVID-19 и вакцинированных Sputnik V. Установлено, что уровень активности IgG переболевших доноров значимо выше ( $p < 0,05$ ), чем у вакцинированных и здоровых доноров.

Показано, что проявляющиеся при COVID-19 патофизиологические процессы, вызванные в том числе избыточной генерацией активированных кислородных метаболитов (АКМ), могут быть причиной аутоиммунных и нейроиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка, синдром Гийена — Барре и идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, а также могут вызывать обострение, как в случае рассеянного склероза.

Известно, что антитела с оксидоредуктазными активностями (супероксиддисмутазной, пероксидазной и каталазной) могут играть значимую роль в регуляции уровня АКМ при аутоиммунных и нейроиммунных заболеваниях, однако их роль при COVID-19 малоизучена. В связи с этим исследование каталазной активности поликлональных IgG здоровых доноров, лиц, переболевших COVID-19, а также вакцинированных против вируса SARS-CoV-2, является актуальной задачей.

Для исследования выбраны образцы плазмы крови четырех групп доноров, сопоставимых по полу и возрасту: переболевшие COVID-19 ( $n = 28$ ); вакцинированные Sputnik V ( $n = 26$ ); вакцинированные Sputnik V после перенесенного COVID-19 ( $n = 13$ ); здоровые доноры, не имеющие аутоиммунных патологий, инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний ( $n = 43$ ). Индивидуальные препараты IgG выделены аффинной хроматографией на Protein G Sepharose, подтверждена их электрофоретическая гомогенность. Характеризующие каталазную активность IgG значения кажущихся  $k_{cat}$ , определены спектрофотометрически по разложению пероксида водорода в присутствии антител.

Показано, что все препараты IgG обладали каталазной активностью. Медианные значения кажущихся  $k_{cat}$  реакции разложения пероксида водорода антителами для исследуемых групп доноров составили ( $\text{мин}^{-1}$ ): переболевшие COVID-19 —  $1,68 \cdot 10^5$ , вакцинированные —  $1,22 \cdot 10^5$ , здоровые —  $0,91 \cdot 10^5$ , переболевшие и вакцинированные —  $0,80 \cdot 10^5$ .

Таким образом, наиболее высокая активность препаратов IgG наблюдалась у доноров, переболевших COVID-19: ее уровень отличался ( $p < 0,05$ ) от активности антител других групп, в то время как статистически значимых отличий между каталазной активностью антител вакцинированных лиц и здоровых доноров обнаружено не было. Эти данные свидетельствуют о возможном участии поликлональных IgG в патогенезе COVID-19.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 21-75-10105.

## РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА ХЕНДРА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

К. О. Плотников<sup>1,2</sup>, А. В. Гладышева<sup>1</sup>, Е. В. Чуб<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ kirill.plotnikov5@yandex.ru

### Аннотация

В ходе работы по созданию набора реагентов для обнаружения РНК вируса Хендра методом ПЦР были разработаны два комплекта олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов для амплификации фрагмента гена *N* вируса. Для проверки их работоспособности была синтезирована искусственная генетическая конструкция pCR2.1-HeV, включающая целевой фрагмент длиной 182 нуклеотида. Наилучший результат в последовательных десятикратных разведениях показал комплект HeV-N1. Помимо этого для амплификации внутреннего контроля на основе транскрипта гена *GAPDH* был разработан комплект олигонуклеотидов, а также проведены работы по оптимизации их концентраций и программы амплификации. Специфичность и отсутствие ложноположительных сигналов была показана для трех типов биологического материала: смыва с носоглотки, мазка из ротоглотки и сыворотки крови.

Вирус Хендра (HeV), как и вирус Нипах, является представителем рода *Henipavirus*, семейства *Paramyxoviridae*. Лабораторные методы диагностики HeV важны, так как клинические особенности заражения вирусом неспецифичны даже при ярко выраженных симптомах на поздней стадии. Хотя до сих пор вспышки инфекции отмечались лишь в Австралии, существует высокая вероятность обнаружения HeV и на других континентах из-за широты ареала летучих мышей — резервуаров и высокой интенсивности авиаперелетов, связанной с развитым туризмом в Австралии и Океании. Вышеперечисленное подтверждает необходимость разработки диагностической тест-системы для своевременного обнаружения этого патогена и предотвращения его широкого распространения. ПЦР метод является наиболее предпочтительным, поскольку совмещает в себе высокую специфичность определения патогена и оперативность получаемых результатов. Цель данной работы заключалась в разработке прототипа набора реагентов для обнаружения РНК вируса Хендра методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

В ходе биоинформатического анализа всех доступных в базе данных GenBank полногеномных последовательностей вируса Хендра было установлено, что ген нуклеопротеина обладает наибольшей консервативностью и является перспективной мишенью для обнаружения двух существующих генотипов HeV (HeV-g1 и HeV-g2). Было разработано два комплекта олигонуклеотидов, состоящих из олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого гибридационно-зонда и амплифицирующих фрагментов длиной 146 и 111 нуклеотидов. Ввиду отсутствия генетического материала вируса Хендра в коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, была проведена работа по сборке фрагмента гена нуклеопротеина длиной 182 нуклеотида синтетическим методом. Полученный ампликон был клонирован в плазмидный вектор pCR2.1. Далее генетическая конструкция pCR2.1-HeV использовалась в качестве положительного контроля для проверки работоспособности комплектов олигонуклеотидов HeV-N1 и HeV-N2. Наилучший результат показал комплект HeV-N1, который амплифицирует целевой фрагмент положительного контроля во всех последовательных десятикратных разведениях от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ .

Для внутреннего контроля ПЦР (ВКО) был подобран комплект олигонуклеотидов, детектирующих транскрипт гена человека — глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа (*GAPDH*). Далее была проведена работа по оптимизации условий амплификации *GAPDH*, заключающаяся в подборе температуры отжига и оптимальных концентраций олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда в реакционной смеси. В ходе проверки установлено, что наилучший результат наблюдается при концентрациях прямого праймера 15 нМ/мл, обратного праймера — 20 нМ/мл и флуоресцентно-меченого зонда — 10 нМ/мл. Специфичность и отсутствие ложноположительных сигналов ВКО были показаны для трех типов биологического материала: смыва с носоглотки, мазка из ротоглотки и сыворотки крови. В качестве отрицательного контроля использовалась деионизованная вода.

Полученные результаты демонстрируют работоспособность подобранных олигонуклеотидов для амплификации целевого участка гена *N* вируса Хендра и внутреннего контроля на основе транскрипта гена *GAPDH*, эффективность которого была проверена на различных типах клинического материала (смыв с носоглотки, смыв с ротоглотки, сыворотка крови).

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖИВОГО ВИРУСА ДЛЯ ОЦЕНКИ SARS-COV-2-СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ХОРЬКОВ\*

П. И. Прокопенко, Е. А. Степанова, А. К. Чистякова, А. Д. Гошина,  
В. А. Матюшенко, И. В. Кудрявцев, И. Н. Исакова-Сивак, Л. Г. Руденко

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

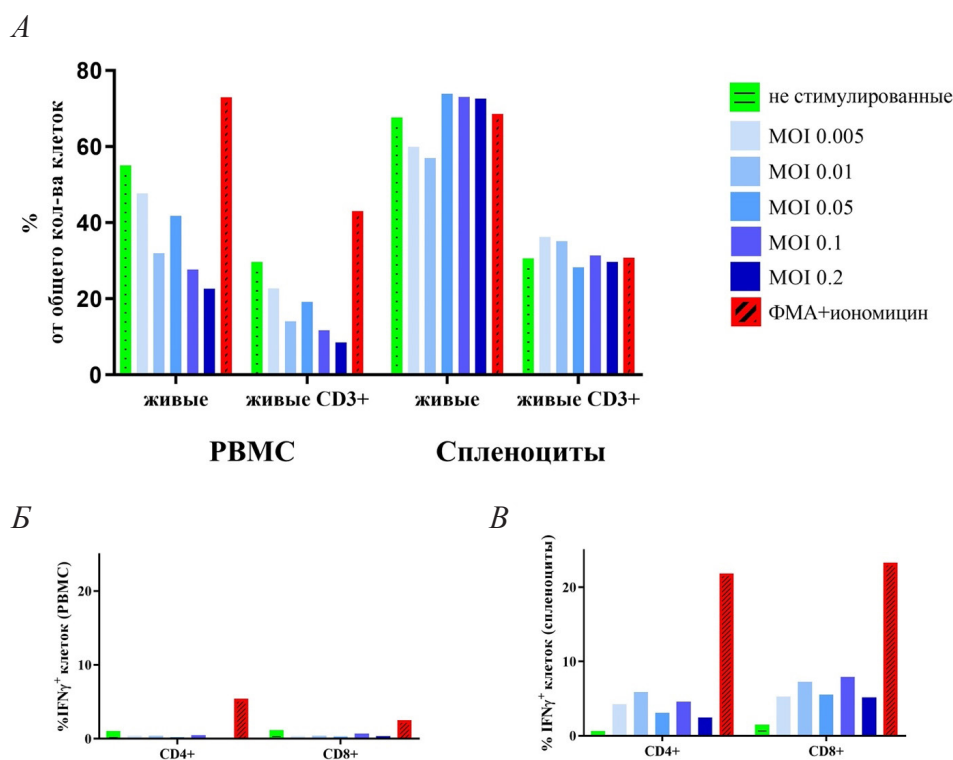
✉ pi.prokopenko@gmail.com

### Аннотация

В настоящей работе проводился поиск оптимальных условий выделения из периферической крови и ткани селезенки хорьков лимфоцитов и стимуляция их живым вирусом SARS-CoV-2 для оценки уровней IFN $\gamma$ -продуцирующих клеток с помощью внутриклеточного окрашивания (ICS) с последующей проточной цитометрией.

Т-клеточное звено иммунного ответа — важнейший компонент иммунитета, который ограничивает тяжесть заболевания и способствует выздоровлению. Большинство исследований по оценке Т-клеточного иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2 проводится с использованием либо отдельных пептидов, охватывающих последовательность некоторых иммуногенных локусов протеома SARS-CoV-2, либо смеси нескольких пептидов. Однако более высокие уровни вирус-специфических Т-клеток были выявлены в экспериментах, где стимуляция иммунных клеток происходила цельным вирусом SARS-CoV-2 за счет полного охвата протеома вируса. Стандартизация методов оценки Т-клеточного иммунного ответа у модельных животных необходима для оценки эффективности новых разрабатываемых вакцинных препаратов и адъювантов, направленных на усиленную стимуляцию Т-клеточного иммунитета.

В данном эксперименте мы использовали биоматериал самок хорька в возрасте 12 месяцев, серопозитивных по показателю IgG к рекомбинантному RBD коронавируса SARS-CoV-2. Мононуклеары периферической



А) Соотношение живых клеток к общему числу после стимуляции различными дозами вируса SARS-CoV-2 (%), Б) % живых CD3+ IFN $\gamma$ + клеток после стимуляции

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ 21-75-30003.

крови (PBMC) выделяли из 15 мл свежей крови, транспортированной с ЭДТА, на градиенте фикола. Спленоциты выделяли из фрагмента селезенки с помощью пестикового гомогенизатора, эритроциты в клеточной субстанции лизировали. Далее все клетки подсчитывали и вносили в 96-луночные планшеты в количестве  $2 \cdot 10^6$  живых клеток, после чего к ним добавляли различные дозы живого цельного коронавируса, предварительно очищенного на градиенте сахарозы. Для стимуляции иммунных клеток использовали вирус SARS-CoV-2 в дозах 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 MOI. Клетки с вирусом инкубировали 16–18 часов при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Далее для остановки клеточного транспорта добавляли во все лунки Брефельдин (Golgi Plug, BD). Спустя 5 часов инкубации при тех же условиях клетки осаждали, удаляли питательную среду и окрашивали моноклональными антителами FITC anti-CD8 (Abcam) и APC anti-CD4 (Sino Biological), а также красителем ZombieAqua (Biolegend). После окраски проводили фиксацию с пермеабиллизацией с помощью CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) по протоколу производителя. Для внутриклеточного окрашивания использовали антитела PE anti-IFN $\gamma$  (Abcam) и Pacific Blue anti-CD3 (BioRad). После покраски популяция клеток анализировалась с помощью проточного цитометра CytoFLEX и программы CytExpert 2.5. В качестве позитивного контроля стимуляции использовалась смесь ФМА (форбол-миристан-ацетат) и иономицина (Biolegend).

Известно, что SARS-CoV-2 способен непосредственно заражать лимфоциты, в том числе в ряде работ было показано, что использование высоких MOI при стимуляции клеток приводит к апоптотической гибели значительной части клеток в эксперименте. В связи с этим мы проанализировали соотношение живых клеток и общего числа клеток в пробах после стимуляции различными дозами вируса. Установлено, что процент живых мононуклеаров периферической крови заметно снижался с увеличением дозы вируса (55 % в контроле, 48 % при MOI = 0,005, 22 % при MOI = 0,2), в то время как в клетках селезенки процент живых клеток был выше, чем среди мононуклеаров (более 67 %) и не наблюдалось зависимости от дозы вируса (рис. 1, А). Процент IFN $\gamma$ -продуцирующих клеток в селезенках был сопоставим при дозах вируса 0,01–0,1 MOI (рис. 1, В). В PBMC процент IFN $\gamma$ -продуцирующих клеток в пробах после стимуляции вирусом был крайне низким (рис. 1, Б).

По результатам работы оптимальной дозой живого вируса SARS-CoV-2 для стимуляции спленоцитов хорьков по использованной нами методике является MOI = 0,01–0,05. Это позволяет добиться баланса между выживаемостью клеток и детектируемым ответом в эксперименте. Использованная методика не подходит для оценки IFN $\gamma$ -продуцирующих клеток среди мононуклеаров периферической крови в связи с низкой выживаемостью клеток.

## ПОТЕНЦИАЛ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА LAMIACEAE ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА

М. А. Проценко<sup>1</sup>, Н. А. Мазуркова<sup>1</sup>, Е. И. Филиппова<sup>1</sup>, Т. А. Кукушкина<sup>2</sup>,  
И. Е. Лобанова<sup>2</sup>, Ю. А. Пшеничкина<sup>2</sup>, Е. П. Храмова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

✉ protsenko\_ma@vector.nsc.ru

### Аннотация

Экстракты растений семейства Lamiaceae проявляют противовирусную активность в отношении штаммов вируса гриппа. При этом наивысший противовирусный эффект в отношении штамма A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1) характерен для водных извлечений *Nepeta cataria* и *Glechoma hederacea*, а в отношении штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) — для этанольного экстракта *Betonica officinalis*.

На сегодняшний день учеными-вирусологами открыто более 25 000 серотипов вируса гриппа. Существующие в наше время противогриппозные препараты вследствие постоянных мутаций вируса гриппа скоро могут снизить или вовсе потерять свою эффективность. Поэтому поиск новых источников для получения эффективных и безопасных противовирусных средств не теряет актуальности.

Растительное сырье весьма перспективно с точки зрения разработки новых лекарственных препаратов, поскольку содержит широкий спектр биологически активных веществ. В частности, растения семейства яснотковых (Lamiaceae) потенциально можно использовать при создании новых препаратов для терапии заболеваний, вызываемых вирусами [1; 2].

В качестве объектов исследования выступили высушенные надземные части 12 видов растений семейства Lamiaceae, собранные на экспериментальном и коллекционном участках ЦСБС СО РАН, в окрестностях новосибирского Академгородка, в Тогучинском районе Новосибирской области. Растительное сырье анализировали на содержание флавонолов, катехинов и танинов. Из сухого сырья были получены сухие водные и этанольные экстракты, которые тестировались на противовирусную активность в отношении штаммов вируса гриппа.

Исследование показало, что в отношении вируса гриппа A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток МДСК активность проявили водные и этанольные экстракты *Nepeta cataria*, *Nepeta sibirica*, *Scutellaria baicalensis*, *Hyssopus officinalis*, *Betonica officinalis*, а также водные экстракты *Dracocephalum moldavica*, *Glechoma hederacea*, *Prunella vulgaris*, *Melissa officinalis* и этанольные экстракты *Origanum vulgare*, *Salvia verticillata*. Индексы нейтрализации вируса гриппа субтипа H5N1 под действием этих экстрактов находились в пределах от 2,25 до 3,75 Ig.

Также показали активность в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) водный и этанольный экстракты *Scutellaria baicalensis*, водный экстракт *Dracocephalum moldavica* и этанольные экстракты *Glechoma hederacea*, *Origanum vulgare*, *Prunella vulgaris*, *Hyssopus officinalis*, *Betonica officinalis*, *Salvia verticillata*. Индексы нейтрализации вируса гриппа субтипа H3N2 под действием этих экстрактов находились в пределах от 2,25 до 4,25 Ig.

Отмечено, что вируснейтрализующий эффект в отношении обоих штаммов проявили водный и этанольный экстракты *Scutellaria baicalensis*, водный экстракт *Dracocephalum moldavica* и этанольные экстракты *Origanum vulgare*, *Hyssopus officinalis*, *Betonica officinalis*, *Salvia verticillata*. Следует заметить, что ни один из экстрактов *Dracocephalum nutans* не показал явной противовирусной активности в отношении исследуемых штаммов вируса гриппа.

На основании данных фитохимического анализа и противовирусной активности были рассчитаны коэффициенты корреляции. Установлена слабая корреляционная зависимость между содержанием в растительном сырье катехинов и противогриппозной активностью экстрактов в отношении вируса гриппа штамма A/chicken/ Kurgan/05/2005(H5N1) (коэффициент корреляции 0,26–0,39). На этом основании был сделан вывод, что данная группа фенольных соединений может влиять на противовирусный эффект растительных экстрактов.

### Литература

1. Abad M. J., Guerra J. A., Bermejo P., Irurzun A., Carrasco L. Search for antiviral activity in higher plant extracts // *Phytother Res.* 2000 Vol. 14. N 8. P. 604–607. DOI: 10.1002/1099-1573(200012)14:8<604::aid-ptr678>3.0.co;2-1
2. Tan Y. P., Houston S. D., Modhiran N., Savchenko A. I., Boyle G. M., Young P. R., Watterson D., Williams C. M. Stachyonic Acid: A Dengue Virus Inhibitor from *Basilicum polystachyon* // *Chemistry.* 2019. Vol. 25. N 22. P. 5664–5667. DOI: 10.1002/chem.201900591



## ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ МЕТОДАМИ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ\*

А. Я. Рак, Е. А. Степанова, Е. А. Баженова, И. Н. Исакова-Сивак

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

✉ alexandrak.bio@gmail.com

### Аннотация

Манипуляции с генетической последовательностью вируса гриппа позволяют разрабатывать противогриппозные вакцины с улучшенными свойствами, а также использовать вирус гриппа в качестве системы доставки генетической информации в клетки. Методика обратной генетики основана на сборке вируса целиком из плазмидных ДНК, несущих все гены вируса. Один из ключевых этапов методики — процесс трансфекции, в ходе которого плазмиды попадают в клетки, где происходит дальнейшая сборка вирионов. Мы сравнили возможность использования различных клеточных линий для получения жизнеспособных холодадаптированных штаммов вируса гриппа с модифицированным или классическим геномом путем электропорации или липофильной котрансфекции набором из восьми плазмид, кодирующих сегменты вирусного генома. Целью работы стало исследование возможности использования альтернативных клеточных линий и липофильного реагента отечественного производства для оптимизации протокола котрансфекции в целях снижения стоимости и трудоемкости процедуры по сравнению с методом электропорации.

Грипп — опасное инфекционное заболевание, для возбудителя которого характерны высокая степень мутационной изменчивости и способность к реассортации генома, что приводит к регулярному появлению новых антигенных вариантов. Вакцинация является одним из наиболее эффективных способов борьбы с гриппозной инфекцией. Штаммы живой гриппозной вакцины (ЖГВ) готовятся методом классической реассортации холодадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) и актуального эпидемического штамма. Для целенаправленного получения вакцинных штаммов с улучшенными свойствами необходимо внести изменения в вирусный геном, что можно сделать только применяя методы обратной генетики. Наличие системы для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ генно-инженерными методами позволяет использовать вирус гриппа в качестве вектора для экспрессии в клетках-мишенях эпитопов других патогенов.

В данной работе изучается возможность использования альтернативных клеточных линий и липофильного агента отечественного производства для получения вирусов гриппа по классическому протоколу методом восьмиплазмидной липофильной котрансфекции (Hoffmann et al., 2002) в качестве альтернативы дорогостоящему методу электропорации. В отличие от последнего, метод липофильной котрансфекции не требует улучшенного качества плазмидной ДНК и ее концентрирования, а также является сравнительно недорогим. Мы использовали систему обратной генетики, разработанную ранее для донора Лен/17 (Isakova-Sivak et al., 2011). Для сборки использовались гены *HA* и *NA* вирусов подтипов H2N2, H7N9, H3N2, H1N1, клонированные в вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT. Кроме того, использовались модифицированные сегменты *NS* (рамка считывания *NS1* укорочена до 126 аминокислот, далее через сайт саморасщепления *P2A* встроена чужеродная генетическая информация, рамка считывания *NEP* сохранена); *NA* подтипа N9 (после окончания полноразмерной последовательности нейраминидазы через сайт *P2A* встроена чужеродная генетическая информация, далее фрагмент гена *NA*, необходимый для упаковки); *HA* подтипа H7 (на N-конце *HA* через гибкий линкер присоединен чужеродный фрагмент). Все плазмиды были получены ранее в отделе вирусологии им. А. А. Смородинцева ФГБНУ ИЭМ. Сборку вирусов на основе восьми плазмид проводили путем трансфекции различных клеточных линий методом липофекции с использованием реагента GeneJector-39 (Molcuta, Россия) в количестве 2 мкл на 1 мкг ДНК или методом электропорации с использованием Neon Transfection System (Thermo, США). Культивирование полученных вирусов проводили на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Успешную сборку жизнеспособных вирусов определяли в реакции гемагглютинации с 1 % куриными эритроцитами.

В рамках выполнения работы были получены жизнеспособные реассортантные штаммы вирусов гриппа А и В с модифицированным и с немодифицированным геномом с применением как метода электропорации, так и липофильной котрансфекции (см. таблицу). Гемагглютинационный титр вирусов, накопленных в РКЭ, составил 512-1024 АЕ.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-75-30003.

**Результаты экспериментов по получению различных штаммов вируса гриппа методом обратной генетики с применением липофильной трансфекции и электропорации**

Подтип	Модификация	Результат липофильной котрансфекции				Результат электропорации
		Vero CCL81	HEK293T + MDCK	HEK293T + MDCK подсев	Vero E6	Vero CCL81
A/H2N2	нет	+	+	+	-	+
A/H1N1	нет	+	+	+	-	+
A/H3N2	нет	-	+	+	+	+
A/H7N9	нет	-	+	+	-	+
A/H7N9	в гене <i>NS</i>	-	+	+	-	+
A/H1N1	в гене <i>NS</i>	-	+	+	-	+
A/H1N1	в гене <i>NA</i>	-	+	+	-	+
B	нет	-	+	+	-	+

Таким образом, применение первого липофильного агента отечественного производства GeneJector-39 может рассматриваться в качестве альтернативного подхода для получения жизнеспособных штаммов вируса гриппа на основе не только тандема клеточных линий HEK293T/MDCK, но и Vero E6 и Vero CCL81, являющихся более удобными для работы и не требующих сокультивирования с клетками-мишенями других линий. Полученные результаты могут стать основой для оптимизации стандартного протокола восьмиплазмидной котрансфекции на этапе подготовки как классических, так и модифицированных штаммов живой гриппозной вакцины.

## МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СРЕДИ ДОМАШНИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

С. О. Садикалиева, Ж. С. Абай, Е. А. Шаяхметов, К. А. Шораева, Б. А. Еспембетов, А. С. Нурпейсова

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, п. Гвардейский, Казахстан*

✉ sadikalieva86@mail.ru

### Аннотация

В данной работе представлены результаты мониторинговых исследований распространения коронавирусной инфекции среди домашних видов животных на территории Республики Казахстан. При изучении проб от домашних видов животных в количестве 160 смывов методом ПЦР в режиме реального времени смывы, взятые от семи животных, показали положительный результат теста на коронавирусную инфекцию.

Пандемия 2019 года, вызванная распространением коронавируса SARS-CoV-2, привела к серьезному санитарному кризису во всем мире. Продолжающаяся вспышка COVID-19 представляет исключительную угрозу для глобального общественного здравоохранения.

Анализ эпизоотической и эпидемической ситуации по коронавирусу в мире, в том числе в странах СНГ и Республике Казахстан, показывает, что обстановка остается сложной и напряженной. Появление SARS-CoV-2 привлекло повышенное внимание к коронавирусам как одним из самых важных патогенных вирусов, а также показало необходимость соответствующей активной подготовки и оперативного реагирования.

Несмотря на меры профилактики и борьбы с SARS-CoV-2, понимание механизмов передачи вируса все еще неполное, в от время как изучение способов его распространения является ключевым для успешной борьбы с этой инфекцией. Существует опасение, что животные могут быть переносчиками вируса, что способствует его ускоренному распространению. В работе Thomas H. C. Sit и Christopher J. Brackman описывается, что в 2003 г. близкородственный SARS-CoV вирус был обнаружен у домашних кошек и собак. Однако информации о восприимчивости домашних животных к SARS-CoV-2 пока мало.

Авторы настоящего исследования при помощи ПЦР с обратной транскрипцией, серологии, секвенирования вирусного генома и вируса изоляции показали, что в Гонконге две из 15 собак из тех домохозяйств, где были подтвержденные случаи заболевания людей COVID-19, были инфицированы SARS-CoV-2.

В работе Ahmed S. Abdel-Moneim и Elsayed M. Abdelwhab описана роль животных как резервуаров, естественных хозяев и экспериментальных моделей. SARS-CoV-2 произошел от животного резервуара, скорее всего, от летучих мышей и панголинов. Также есть сообщения об антропонозной передаче вируса кошкам, собакам, тиграм, львам и норкам. На данный момент нет убедительных доказательств естественного перехода вируса от животного к человеку и от животного к животному. В той же работе описывается, что обезьяны, хомяки, хорьки, кошки, землеройки, трансгенные мыши и фруктовые летучие мыши являются более восприимчивыми, в то время как собаки, свиньи и домашняя птица устойчивы к данному вирусу.

В связи с этим актуально определение роли животных в динамике распространения вируса. Выделение среди животных новых возникающих патогенов и изучение их биофизических, физико-химических, биологических и молекулярно-генетических свойств позволяет определить степень их устойчивости и длительности сохранения в окружающей среде. Это является основой для разработки специфических средств дезинфекции, диагностики, терапии и профилактики заболевания.

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в проведении мониторинговых исследований, посвященных распространению коронавирусной инфекции среди домашних видов животных, и дальнейшем изучении биофизических и физико-химических свойств изолятов коронавируса, выделенных на территории Республики Казахстан.

В настоящее время в рамках молодежного проекта «Мониторинг распространения коронавируса среди домашних видов животных и изучение биофизических и физико-химических свойств изолятов коронавируса, выделенных на территории Республики Казахстан» ИРН AP13067641 были проведены первые мониторинговые экспедиции. Из изолятора временного содержания собак и кошек были отобраны пробы от животных с симптомами болезни в количестве 160 смывов. Идентификация коронавирусной инфекции в пробах проводилась методом ПЦР в режиме реального времени. В результате установлено, что семь проб из 160 дали положительный результат при тестировании на наличие коронавирусной инфекции. В данный момент ведется работа по изучению генома выделенного вируса методом секвенирования для определения связи между животным и человеческим вирусом SARS-CoV-2.

**TEMPLATE-SWITCHING APPROACH USING RACE TO STUDY NOVEL VIRUSES \***V. V. Saenko<sup>1</sup>, N. I. Borisova<sup>1</sup>, M. D. Chanyshv<sup>1</sup>, G. V. Roev<sup>1,2</sup>, M. I. Nadtoke<sup>1</sup>, V. G. Akimkin<sup>1</sup>, K. F. Khafizov<sup>1</sup><sup>1</sup>*Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow*<sup>2</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*✉ [valeriia.kaptelova@gmail.com](mailto:valeriia.kaptelova@gmail.com)**Abstract**

The COVID-19 pandemic has evoked enormous interest of researchers from around the world in studying viruses, especially those originating from animal reservoirs, as they are known to occasionally infect humans and lead to epidemics. At the same time, the potential number of existing viruses on the planet is huge, and we are aware about only a small fraction of them.

To study viruses and sequence their genomes, researchers usually use the genome enrichment technology, i.e. PCR-amplification with specific primers. This approach is much cheaper as compared to total DNA/RNA sequencing. However, scientists sometimes deal with novel viruses or viruses with large genomes, which is often connected with serious problems and limitations if primer-specific amplification is used. To overcome these problems, the researchers are trying to use other approaches, such as template switching that can help to enrich target or random viruses.

In this work, we describe modified rapid cDNA end amplification (RACE) for viral genome sequencing. The presented approach provides for detecting multiple RNA viruses within a single sample by using oligo(dT)- or virus-specific primers, which is suitable for epidemiological surveillance and study of the genetic diversity of various viruses in particular.

**Methods**

RNA was extracted from oropharyngeal swabs using QIAamp Viral RNA Mini Kit in compliance with the manufacturer's instructions. To validate the template-switching reaction, we used the Mint cDNA synthesis kit (Evrogen). Then the universal primer from the kit was changed to a specific target-primer SARS-CoV-2 with an adapter that is used in the protocol. Paired-end libraries were constructed with Nextera™ Library Prep. Sequencing was then performed on the Illumina MiSeq platform.

The resulting raw reads were mapped to the SARS-CoV-2 reference genome using the Bowtie2 tool. The analysis of the obtained data showed that in the samples with universal primer, we obtained only single reads of SARS-CoV-2 and a complete absence of reads associated with the genomes of other viruses. For the samples prepared with specific target primers, the coverage was about 2,000 bp in target areas. Since single reverse specific target primers were designed at the 3'-end of the genome, we obtained a good coverage of a fairly long fragment in this region of the genome. These results also indicate that quality of the samples should be high enough to apply this method directly according to the manufacturer's recommendations. We also succeeded in obtaining good coverage of the 3'-terminal part of the genome, which can be useful for the discovery and study of new viruses. If we know a small (100–300 bp) part of the genome of the virus obtained during metagenomic sequencing, and if based on this part we can design a specific target primer, then it is possible to sequence a longer part of the genome using this modified technology, which can potentially promote studying of new viruses which do not possess high homology with known viral genomes.

---

\* This study was supported by the RSCF grant № 22-24-00078.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ\*

К. А. Свири́н<sup>1</sup>, Е. И. Кривошеина<sup>1</sup>, Е. В. Чуб<sup>1</sup>, М. Ю. Карташов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ mikkartash@yandex.ru

### Аннотация

При коинфекции ВГС/ВИЧ наблюдается повышение интенсивности размножения ВГС и ускоренные темпы прогрессирования заболевания печени. В работе показано, что РНК ВГС обнаруживается у 32,9 % ВИЧ-инфицированных пациентов в Новосибирской области (обследуемая выборка составила 185 человек). Наиболее часто обнаруживается субгенотип 1b (52,5 %), следующий по частоте — 3a (34,5 %), гораздо реже 1a (11,5 %) и 2a (1,5 %). Наиболее часто коинфицирование ВГС/ВИЧ наблюдается в возрастных группах 35–40 лет и старше 40 лет. Достоверных различий встречаемости РНК ВГС или различий в распределении генотипов между мужчинами и женщинами выявлено не было.

По разным данным глобальный уровень инфицирования вирусом гепатита С (ВГС) оценивается в пределах 175–185 млн. человек или даже выше, что составляет 2,3–2,5 % всего населения планеты. ВГС и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) характеризуются сходными путями передачи и имеют схожие группы риска, в которых повышена вероятность приобретения одновременно сразу двух этих инфекций. Взаимное усугубление течения вирусных инфекций — серьезная проблема, возникающая при коинфицировании ВИЧ-положительных пациентов парентеральными вирусными гепатитами. Микст-инфицирование приводит к обоюдному утяжелению заболеваний, неэффективности проводимого лечения, развитию атипичных форм, которые невозможно определить при помощи серологических методов исследования, а также необходимости коррекции противовирусной терапии для исключения дополнительного гепатотоксичного влияния лекарственных средств.

Цель данной работы состояла в определении частоты встречаемости и молекулярно-генетической характеристики изолятов ВГС, выделенных от ВИЧ-положительных пациентов в Новосибирской области.

Исследование проведено на 185 образцах сывороток (96 мужчин и 89 женщин). Образцы анализировали на наличие генетического материала ВГС методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов HCV-FL («АмплиСенс», Россия). Выявленные положительные образцы генотипировали путем амплификации фрагмента гена *NS5b* в двухраундовой ПЦР с последующим определением нуклеотидной последовательности ампликонов методом Сенгера. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу GenBank под номерами ON814585–ON814645.

РНК ВГС была обнаружена в 61 образце, уровень коинфицирования у ВИЧ-положительных пациентов Новосибирской области составил 32,9 % (95 % доверительный интервал: 26,6–39,5). Уровень инфицирования ВГС у ВИЧ-позитивных лиц с возрастом возрастает: в группе до 30 лет встречаемость коинфицирования 18,7 %; в группе 30–35 лет — 29,4 %; в группе 35–40 лет — 36,4 %; в группе старше 40 лет — 35,1 %. Распределение субгенотипов в изучаемой выборке изолятов ВГС: 1b (52,5 %), 3a (34,5 %), 1a (11,5 %) и 2a (1,5 %). Известно, что наиболее неблагоприятный прогноз развития ВГС-инфекции характерен для генотипа 1, причем для субтипа 1b свойственны самые высокие показатели вирусемии, а также низкий ответ на интерферонотерапию.

Достоверных различий встречаемости РНК ВГС у мужчин по сравнению с женщинами не выявлено ни в одной возрастной группе. Статистический анализ также не выявил различий в распределении генотипов между обследованными мужчинами и женщинами.

\* Исследования выполнены при поддержке государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ГЗ-2/22 (№ 122040600156-3 в ЕГИСУ НИОКТР).

© К. А. Свири́н, Е. И. Кривошеина, Е. В. Чуб, М. Ю. Карташов, 2022

## РЕАЛИЗАЦИЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ SARS-COV-2 В РАМКАХ РЕГУЛЯРНОГО МОНИТОРИНГА ГЕНОВАРИАНТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

С. Ю. Селезов, Е. А. Евстифеев, А. А. Остроушко, К. Ф. Хафизов, В. Г. Акимкин

*ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва*

✉ selezov@cmd.su

### Аннотация

Для визуального представления результатов секвенирования SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации в рамках проекта VGARus была разработана и введена в эксплуатацию аналитическая система VGARus Dashboard. Аналитическая система реализована на основе BI-системы Yandex Datalens и доступна на информационном портале проекта VGARus ([genome.criie.ru](http://genome.criie.ru)) для сотрудников организаций Роспотребнадзора.

### Введение

Обширный мониторинг новой коронавирусной инфекции, развернутый, на территории всего мира в целом и Российской Федерации в частности, с начала 2020 года поставил ряд новых требований к формату регулярных эпидемиологических мероприятий. Важнейшими пунктами стали постоянный сбор образцов нового патогена на территории всех субъектов РФ, оперативная транспортировка лабораторных проб от места взятия к центрам диагностики, а также организация централизованного хранилища геномных данных, обеспечивающего внутренний учет проводимых исследований. Основная цель перечисленных действий — обеспечение инфраструктуры для регулярного эпидемиологического мониторинга патогенов циркулирующих на территории РФ, а также формирование аналитической системы представления накопленных данных в реальном времени.

### Результаты

Аналитическая система VGARus Dashboard реализована на основе BI-системы Yandex Datalens в составе облачной платформы данных Yandex Cloud, что позволяет избежать ряда важных проблем, возникающих при построении аналогичных систем без необходимости привлечения дополнительных вычислительных ресурсов. Учитывая требования к конфиденциальности данных, аналитическая система VGARus Dashboard реализована в формате приватного дашборда с необходимостью авторизации через учетную запись Yandex. Права доступа для новых пользователей в системе выдаются администратором дашборда DataLens в индивидуальном порядке. Обновление данных происходит ежедневно и автоматически. При обновлении данные сначала выгружаются с портала [genome.criie.ru](http://genome.criie.ru), проходят предварительную очистку и агрегируются. Затем полный датасет метаданных переносится в реляционную базу данных (PostgreSQL), где на его основе формируются вспомогательные таблицы, упрощающие дальнейшее представление информации. Данные из реляционной базы PostgreSQL загружаются в информационную систему Yandex DataLens на уровне сущности «Подключение». На основе существующего «Подключения» в системе Yandex DataLens формируются датасеты, служащие основой для построения графиков и таблиц, совокупность которых и представляет собой дашборд Yandex DataLens.

Для агрегации данных и формирования датасетов в системе Yandex DataLens предусмотрены встроенные функции (логические, математические, агрегатные и др.), а также возможность реализовывать SQL (Structure Query Language) запросы к подключениям (включая функции *merge()* и *join()*). С другой стороны, при возникновении потребности в дополнительных агрегационных функциях формирование датасета можно проводить локально с применением любых средств обработки данных с последующей загрузкой в облако уже готовой таблицы. В таком случае сущность «Подключение» в парадигме Yandex DataLens будет тождественна сущности «Датасет». Такой подход значительно расширяет возможности представления данных в Yandex DataLens; он также использовался при построении аналитической системы VGARus Dashboard.

С учетом использования готового решения для визуального представления данных основной задачей являлось построение системы автоматического обновления источников данных, лежащих в основе созданного дашборда. Все процедуры передачи данных реализованы на основе языка Python в виде скриптов с использованием сторонних библиотек для взаимодействия с базой данных PostgreSQL, таблицами данных, реализации HTTP-запросов (*psycopg2*, *pandas*, *requests*).

---

Таким образом, была разработана информационная система VGARus Dashboard, позволяющая визуализировать данные национальной базы геномных последовательностей SARS-CoV-2 – VGARus. Аналитическая система представляет собой совокупность таблиц и графиков позволяющих описать процессы загрузки сиквенсов, представленность различных геновариантов SARS-CoV-2 на территории субъектов Российской Федерации в конкретный период времени, а также позволяет осуществлять регулярный мониторинг вновь загружаемых сиквенсов на предмет выявляемых геновариантов.

## НАКОПЛЕНИЕ ФИТОВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ В УСЛОВИЯХ ОТСУТСТВИЯ ОБНОВЛЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ

О. А. Собко, П. В. Фисенко

Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А. К. Чайки, п. Тимирязевский

✉ o.eyvazova@gmail.com

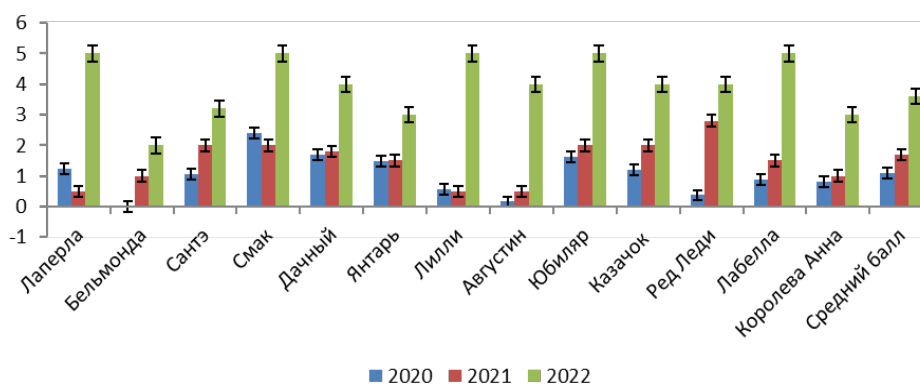
### Аннотация

Сегодня в мире идентифицировано около 40 патогенных вирусов, способных поражать картофель. Каждый из этих патогенов может привести к потере от 10 до 60 % урожая, а при смешанной вирусной инфекции доля погибшего урожая может быть еще больше. Со временем накопление инфекции и передача ее потомству через клубни приводит к вырождению сорта и падению его урожайности на 30–80 %.

Сегодня в мире идентифицировано около 40 патогенных вирусов, способных поражать картофель. Наиболее распространенные и опасные с точки зрения экономики вирусы картофеля — это вирусы мозаичной группы PVY (*Potato virus Y*), PVX (*Potato virus X*), PVS (*Potato virus S*), PVM (*Potato virus M*), вирус картофеля PVA (*Potato virus A*) и вирус скручивания листьев картофеля PLRV (*Potato leaf roll virus*), вирус метельчатости верхушки картофеля PMTV (*Potato mop top virus*), а также вириод веретеновидности клубней PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*). Каждый из этих патогенов способен привести к потере от 10 до 60 % урожая, а при смешанной вирусной инфекции — еще больше [1]. Со временем накопление инфекции и передача ее потомству через клубни приводит к вырождению сорта и падению его урожайности на 30–80 % [2]. Кроме того, большую роль в постепенном накоплении инфекции на семенных посадках картофеля разных категорий играет ее латентный характер, когда не только не наблюдается какого-либо визуального проявления, но и, в силу незначительного количества инфекции, она не улавливается традиционными методами диагностики [3].

В течение трех лет мы проводили изучение проявления фитовирусов на 13 сортах в посадках картофеля, чтобы определить реальную пораженность растений в период вегетации и накопления фитовирусной инфекции на опытном поле ФГБНУ ФНЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А. К. Чайки.

Мы отметили, что при посадке картофеля на одном и том же поле и использовании семян, полученных с этого поля, увеличивается количество фитовирусной инфекции. В клубнях картофеля из года в год происходило накопление вирусной инфекции: если в 2020 году средний балл поражения по всему полю на исследуемых сортах картофеля составил 1,1, то в 2022 году — 3,6. На большинстве изучаемых нами сортов проявление фитовирусной инфекции увеличивалось с каждым вегетационным периодом у сортов Бельмонда, Сантэ, Дачный, Янтарь, Августин, Юбилар, Казачок, Ред Леди, Лабелла и Королева Анна. На сортах Лаперла, Смак и Лилли во второй год изучения проявление вирусной инфекции незначительно снизилось, по сравнению с 2020 годом, а затем резко возросло в 2022 году. На сорте Бельмонда в 2020 г. практически не наблюдалось внешних симптомов фитовирусной инфекции, однако в последующие годы она накапливалась в клубнях, и в результате растений с симптомами фитовирусной инфекции становилось больше. То же самое мы наблюдали на сортах Августин и Ред Леди (см. рисунок).



Проявление вирусной инфекции на сортах картофеля по годам



На всех растениях картофеля фитовирусы проявлялись следующим образом: мозаичность разной степени интенсивности в зависимости от сорта и количества вирусов в растении, карликовость, межжилковый хлорозом, красная кайма по краю листа, волнистость края листа, курчавость листовой пластины [4]. Изучаемые сорта мы проверяли на наличие вирусной инфекции в лабораторных условиях с помощью PCR-RT: растения картофеля несли смешанную вирусную инфекцию, состоящую из вирусов мозаичной группы, а также PSTVd и PLRV.

Таким образом, основные способы защиты картофеля от вирусных болезней — выбраковка инфицированных семенных клубней, оздоровление семенного материала, уничтожение насекомых-переносчиков, а также минимизация вероятности перезаражения [2].

### **Литература**

1. Павлова Е. А. Диагностика скрытой вирусной инфекции картофеля — важный этап семеноводства // Защита и карантин растений. 2014. № 2. С. 15–16.
2. А. М. Малько, А. В. Живых, М. М. Никитин, П. А. Французов, Н. В. Стацок, В. Г. Джавахия, А. Г. Голиков. Мониторинг вирусных инфекций картофеля с использованием матричной ПЦР-диагностики // Картофель и овощи. 2017. № 12. С. 26–29.
3. Фоминых Т. С., Иванова Г. П., Медведева К. Д. Мониторинг вирусных болезней картофеля в Псковской и Астраханской областях России // Вестник защиты растений 2017. № 4(94). С. 29–34.
4. Собко О. А., Фисенко П. В., Ким И. В., Мацишина Н. В. Зараженность 7 сортов картофеля вирусами в полевых условиях Приморского края РФ // Овощи России. 2022. № 1. С. 79–85.

## СРАВНЕНИЕ ТЯЖЕСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТКАНЯХ ЛЕГКИХ ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ВАРИАНТАМИ ВИРУСА SARS-CoV-2 НА МОДЕЛИ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА

Е. В. Спиридонова, Е. К. Ивлева, А. В. Шиповалов, Г. А. Кудров, В. В. Омигов, О. В. Пьянков, О. С. Таранов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ e.spiridonova@g.nsu.ru

### Аннотация

Изучены патоморфологические особенности инфекционного процесса, вызванного различными генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. Тяжесть заболевания оценена по гистологическим препаратам легких как основного органа-мишени.

В настоящее время Всемирная организация здравоохранения выделяет пять основных генетических вариантов, вызывающих обеспокоенность (VOC, *Variant of Concern*) вируса SARS-CoV-2: альфа, бета, гамма, дельта и омикрон. Каждый из них имеет ключевые мутации, которые оказывают эффекты на биологические свойства коронавируса.

Моделирование коронавирусной инфекции на экспериментальных животных играет важную роль в исследовании патогенеза заболевания и оценке эффективности противовирусных препаратов и вакцин. Экспериментальные животные должны быть восприимчивы к исследуемому возбудителю и воспроизводить клиническое течение и патологию, наблюдаемую у людей. По мнению многих авторов, сирийские хомячки являются адекватной моделью для изучения репликации вируса SARS-CoV-2 в тканях дыхательных путей, что способствует дальнейшему изучению патогенеза вируса и защитных механизмов организма, наблюдаемых в том числе и у людей.

При изучении патогенности новых VOC вируса SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка основным методом определения тяжести патологических изменений является гистологический анализ повреждений тканей легкого животных после интраназального заражения.

В работе исследовано пять штаммов вируса SARS-CoV-2, полученных из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» Роспотребнадзора. Пять штаммов выделены в разные периоды пандемии на территории РФ и относятся к генетическим VOC, имеющим набор значимых аминокислотных замен поверхностного антигена. В качестве референс-штамма был использован hCoV-19/Australia/VIC01/2020 вируса SARS-CoV-2, полученный из Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (VIDRL), Мельбурн, Австралия.

В эксперименте использовали самцов и самок беспородных сирийских хомячков с массой тела 80–100 г. Животные были получены из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» Роспотребнадзора.

Золотистых хомячков заражали различными штаммами коронавируса и через 120 ч выводили из эксперимента. Во всех случаях на сканах тотальных парафиновых срезов сегментов легкого проводили демаркацию патологических очагов для морфометрического анализа. Затем площадь переводили в баллы.

Наиболее выраженные патологические изменения при значительных площадях поражения ткани легких наблюдались в группе животных, инфицированных штаммом бета. Преобладала воспалительно-клеточная инфильтрация и отек стенок альвеол, что приводило к консолидации паренхимы. Вариант в целом имел схожую патологическую картину, отличаясь более интенсивным проявлением плазмоемorrhагии. Вариант альфа и референс-штамм Victoria выделялись менее выраженной степенью консолидации легочной ткани, суммарно меньшей площадью, чем при заражении другими VOC. В легких животных, зараженных штаммом омикрон, признак консолидации отсутствовал, отмечена воспалительно-клеточная инфильтрация стенок альвеол, а явления плазмоемorrhагии и отека были менее выражены, чем у вариантов дельта и бета.

Результаты гистологических исследований продемонстрировали высокую чувствительность используемой модели животных к вариантам коронавирусной инфекции при интраназальном заражении. Степень выраженности патоморфологических изменений несколько коррелирует со значениями ИД50. Наиболее патогенный штамм коронавируса — вариант Бета, он вызывает ярко выраженные патоморфологические изменения легких инфицированных сирийских хомячков.

Полученные данные использованы для оценки пандемического потенциала вызывающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2, выделенных на территории РФ.

**Литература**

1. Aguiar D., Lobrinus J. A., Schibler M., Fracasso T., Lardi C. Inside the lungs of COVID-19 disease // *Int. J. Legal Med.* 2020. N 134(4). P. 1271-1274. DOI: 10.1007/s00414-020-02318-9
2. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006. N 124(4). P. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015
3. Astuti I. I. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a review of the viral structure and response of the host // *Diab. Metab. Sindr.* 2020. 14:407-412. DOI: 10.1016/j.dsx.2020.04.020
4. Corman V. M., Lienau J., Witzenth M. Coronaviruses as a cause of respiratory infections. *Therapist (Berl).* 2019. N 60. P. 1136–1145. DOI: 10.1007/s00108-019-00671-5
5. Зайратьянц О. В., Тарасова Л. Б. Национальное руководство по патологической анатомии. Частная патологическая анатомия. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2015. 696 с.

## ОЧИСТКА КОРОНОВИРУСА SARS-COV-2 ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ\*

И. А. Сычев, В. А. Матюшенко, И. Н. Исакова-Сивак

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

✉ sychev.ia@iemspb.ru

### Аннотация

Изучение Т-клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 часто проводится с использованием пула пептидов, покрывающих последовательность какого-либо белка вируса. Однако для максимального покрытия вирусного протеома требуется стимуляция иммунных клеток живым коронавирусом. В настоящем исследовании отработывали протокол стимуляции мононуклеаров периферической крови человека живым вирусом SARS-CoV-2, очищенным на градиенте сахарозы.

Новый коронавирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19 и унесший более шести миллионов жизней, циркулирует в человеческой популяции с ноября 2019 года [1]. Подавляющее большинство экспериментов по оценке Т-клеточного иммунитета к коронавирусу проводят либо с использованием выбранных Т-клеточных эпитопов, либо с использованием пула пептидов, представляющих некоторые иммуногенные локусы протеома SARS-CoV-2 [2]. Однако использование цельного вируса SARS-CoV-2 для стимуляции иммунных клеток позволяет выявлять более высокие уровни вирус-специфических Т-клеток [3]. В настоящем исследовании мы проводили очистку вируса SARS-CoV-2 для удаления примесей, а также отработывали протокол стимуляции мононуклеаров периферической крови (МПК) COVID-19 реконвалесцентов живым коронавирусом для определения уровней вирус-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти методом проточной цитометрии.

В работе использовался вирус hCoV-19/St\_Petersburg-3524S/2020 (GISAID EPI\_ISL\_415710). Вирус накапливали на клетках линии Vero-CCL81, культивируемых в среде DMEM с добавлением 2 % FBS (фетальная бычья сыворотка), 1× антибиотика-антимикотика и 10 мМ HEPES. Зараженные вирусом клетки инкубировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 ч, после чего собирали супернатант и осветляли центрифугированием при 2 200 g 15 минут. Далее вирус 4 ч осаждали ультрацентрифугированием при 34 000 g, 4 °С. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 1 мл стерильного раствора HEPES/EDTA (10 мл 1М HEPES и 0,3 г EDTA на 1 л dH<sub>2</sub>O) с последующим концентрированием вируса в 20/60 % градиенте сахарозы, приготовленном с использованием HEPES/EDTA. После центрифугирования при 146 000 g, 4 °С в течение 2 ч интерфазу (рис. 1) собирали и дополнительно промывали HEPES/EDTA путем центрифугирования при 67 000 g, 4 °С в течение 1,5 ч. Конечный осадок, содержащий живой SARS-CoV-2, гомогенизировали в 1 мл HEPES/EDTA и хранили в одноразовых аликвотах при 70 °С. Титр вируса определяли методом предельных разведений на клетках Vero, с вычислением 50 %-й тканевой цитопатической дозы (ТЦИД<sub>50</sub>).

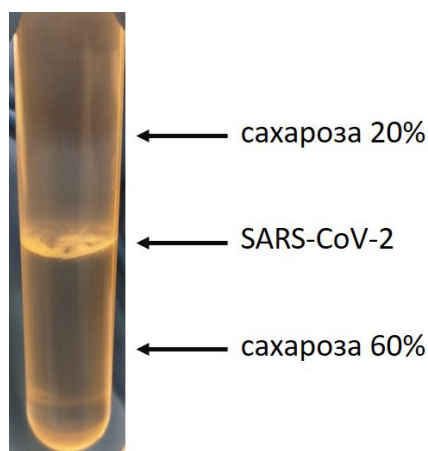


Рис. 1. Вирус SARS-CoV-2 на интерфазе 20/60 % градиента сахарозы

Для оценки уровней вирус-специфических Т-клеток памяти мы разработали протокол для стимуляции МПК доноров, выздоровевших от COVID-19, с помощью живого SARS-CoV-2. Для этого МПК донора, собранные через 1 месяц после начала заболевания, стимулировали вирусом с множественностью заражения (МОИ) 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001 (количество ТЦИД<sub>50</sub> на 1 клетку). В качестве положительного контроля для стимуляции использовали смесь РМА + иономицин. Фенотип клеток определяли путем обработки флуоресцентно-мечеными антителами к поверхностным маркерам CD3, CD4, CD8, CD45RA и CCR7, а специфичность выявляли путем внутриклеточной детекции IFN $\gamma$ . Эффекторные Т-клетки памяти с фенотипом CD4 и CD8, продуцирующие IFN $\gamma$ , были обнаружены на значительно более высоких уровнях, когда для стимуляции использовались относительно низкие дозы вируса — МОИ 0,01 и 0,001 (рис. 2). Таким образом, доза вируса, соответствующая МОИ = 0,001, может быть рекомендована для оценки уровней Т-клеток памяти в исследованиях клеточного иммунитета у лиц, перенесших COVID-19.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-75-30003.  
© И. А. Сычев, В. А. Матюшенко, И. Н. Исакова-Сивак, 2022

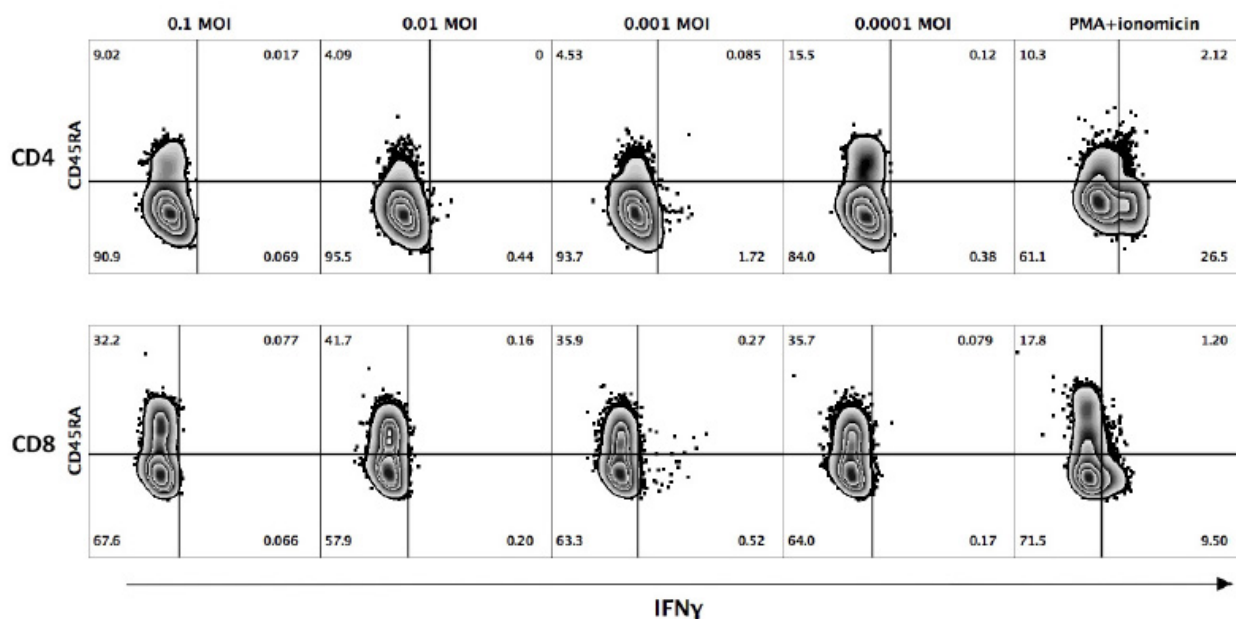


Рис. 2. Продукция  $\text{IFN}\gamma$   $\text{CD4}^+$  (верхняя панель) и  $\text{CD8}^+$  (нижняя панель) Т-клетками памяти после стимуляции различными дозами живого SARS-CoV-2. Продукцию  $\text{IFN}\gamma$  оценивали с помощью проточной цитометрии

### Литература

1. Worldometer of COVID-19 Coronavirus Pandemic [Электронный ресурс]. <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (дата обращения 24.07.22)
2. Grifoni A, Weiskop D, Ramirez S. I. et al. Targets of T-Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals // Cell. 2020. N 181(7). P. 1489–1501.e15.
3. Isakova-Sivak I., Stepanova E., Matyushenko V. et al. Development of a T Cell-Based COVID-19 Vaccine Using a Live Attenuated Influenza Vaccine Viral Vector // Vaccines. 2022. N 10. P. 1142.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

Г. М. Токин

*Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва  
Ракетно-космическая корпорация «Энергия» им. С. П. Королёва, Москва*

✉ njrb@mail.ru

### Аннотация

Натуральная оспа — острое инфекционное особо опасное заболевание вирусной этиологии, относящееся к карантинным инфекциям. Возбудитель — ДНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству *Poxviridae*, роду *Orthoroxviruses*. В результате успешно проведенной под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) международной программы натуральная оспа была искоренена во всем мире. По рекомендации глобальной комиссии по сертификации ликвидации оспы, вакцинация против этой инфекции была отменена в 1980 г. Как следствие, за последние 40 лет человечество утратило иммунитет к данному возбудителю. Хотя вирус натуральной оспы считается побежденным, существует вероятность его возвращения в результате эволюционных преобразований зоонозных видов ортопоксвирусов. Кроме того, образцы натуральной оспы хранятся в двух лабораториях: в ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) и CDC (США). Высокая контагиозность, тяжесть протекания болезни и высокое число летальных исходов влекут за собой возможность использования оспы в качестве биологического поражающего агента, что говорит о важности создания высокоэффективных и специфичных тест-систем для индикации и идентификации возбудителя данной инфекции.

Самыми перспективными тест-системами считаются биосенсоры, где в качестве чувствительного элемента используются моноклональные антитела (МкАт). Способом получения МкАт является гибридомная технология, важнейшим этапом которой является процесс иммунизации, где в качестве иммуногена используются рекомбинантные белки вируса осповакцины. В настоящей работе представлены результаты исследований иммуногенных белков вируса осповакцины, локализованных на внешней мембране вириона: L1R, A27L, B5R, D8L, A33L; рассмотрены их молекулярная структура и свойства.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ТЕРАПИИ САРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Д. Р. Файзуллина<sup>1,2</sup>, Т. И. Манухова<sup>2</sup>, Е. А. Евтушенко<sup>2</sup>, С. В. Цибульников<sup>1</sup>,  
И. В. Уласов<sup>1</sup>, Н. А. Никитин<sup>2</sup>, О. В. Карпова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

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

✉ DFaizullina@yandex.ru

### Аннотация

Использование систем доставки для лекарственных препаратов позволяет уменьшить побочные эффекты химиотерапии и повысить ее эффективность. Структурно модифицированные фитовирусы обладают широким спектром свойств, которые позволяют рассматривать их в роли нового инструмента для таргетной терапии рака. СЧ ВТМ и СЧ ВМАльт демонстрируют высокий уровень адсорбции клетками саркомы Юинга и эффективное проникновение в клетки-мишени.

Наночастицы успешно используются для доставки лекарств при лечении онкологических заболеваний с 1995 года. Для многих естественных и искусственно синтезированных материалов исследовалась возможность доставки активных молекул, однако поиск оптимальной системы доставки до сих пор остается актуальной задачей [1]. Вирусы растений безопасны для человека и животных, недороги в производстве, а также биоразлагаемы и обладают большим потенциалом для применения в области биотехнологии и медицины. Представленная работа посвящена изучению возможности применения структурно модифицированных вирусов растений в терапии саркомы Юинга *in vitro*.

В качестве системы доставки в исследовании использовались структурно модифицированные сферические частицы (СЧ), полученные при термической перестройке вирионов вируса табачной мозаики (СЧ ВТМ) и вируса мозаики альтернантеры (СЧ ВМАльт). Были получены СЧ двух разных размеров: 107 нм (СЧ ВТМ) и 186 нм (СЧ ВМАльт) [2; 3]. Размер частиц был определен с помощью метода анализа траекторий наночастиц (NanoSight NS500, NanoSight NTA 2.3 software). СЧ обоих типов были конъюгированы с флуорофором FITC (Fluorescein isothiocyanate). В работе были задействованы следующие клеточные культуры: ряд первичных короткоживущих опухолевых клеточных культур человека, выделенных из опухолевого материала в процессе резекции — саркома Юинга (ES36, T46); перевиваемая линия клеток саркомы Юинга (A673); в качестве контроля использовались фибробласты человека (M19).

В рамках проделанной работы были изучены два важнейших аспекта, позволяющих рассматривать СЧ ВТМ и СЧ ВМАльт в качестве перспективных носителей для направленной доставки лекарств в опухоли: адсорбция и проникновение в клетку. Было продемонстрировано связывание СЧ с клетками-мишенями и оценен уровень их проникновения для всех используемых клеточных линий. Кроме того, проникновение частиц в клетку наглядно подтверждалось в экспериментах с использованием окраски актина (родамин-фаллоидин) и ядер (Hoechst 33342, NucBlue™ Live ReadyProbes™) после пятичасовой инкубации с СЧ мечеными FITC. Данные фиксировались при помощи флуоресцентного микроскопа (EVOS M5000) и проточного цитофлуориметра (Sony SH800). Анализ результатов адсорбции и проникновения частиц в клетки проводился с использованием зеленого лазера (длина волны — 561 нм).

Все сферические частицы продемонстрировали способность адсорбироваться на клетках человека. Согласно результатам эксперимента по оценке способности СЧ проникать в клетки, все частицы показали схожие паттерны на модельных клеточных линиях; наилучший результат показали частицы, полученные из вирионов ВМАльт.

Эти данные указывают на перспективность работы с СЧ ВТМ и СЧ ВМАльт для терапии рака.

### Литература

1. Truong N. P., Whittaker M. R., Mak C. W., Davis T. P. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery // Expert opinion on drug delivery. 2015. Vol. 12, N 1. P. 129–142.
2. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // Journal of General Virology. 2011. Vol. 92, N 2. P. 453–456.
3. Manukhova T. I., Evtushenko E. A., Ksenofontov A. L., Arutyunyan A. M., Kovalenko A. O., Nikitin N. A., Karpova O. V. Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles // Plos one. 2021. Vol. 16, N 7. P. e0255378.

## ДЕТЕКТИРОВАНИЕ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ\*

А. К. Чистякова, Е. А. Степанова, И. Н. Исакова-Сивак, Л. Г. Руденко

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

✉ [anna.k.chistiakova@gmail.com](mailto:anna.k.chistiakova@gmail.com)

### Аннотация

В работе были созданы и апробированы протоколы для генотипирования коронавируса путем применения полимеразной цепной реакции с дальнейшим определением подтипа коронавируса в пробе методом пиросеквенирования с системой PyroMark Q24. Полученные протоколы позволяют определять участки последовательности гена S-белка, которые являются переменными у штаммов коронавируса, циркулирующих на данный момент.

Продолжающаяся пандемия COVID-19, связанная с высокими темпами распространения и изменчивостью коронавируса SARS-CoV-2, ставит перед нами задачи создания и обновления систем детекции различных вариантов коронавируса. Основная масса функциональных аминокислотных замен, определяющих принадлежность коронавируса к той или иной генетической линии, находится в S-белке. Замены у разных вариантов могут быть скомбинированы между собой, также в одной позиции могут находиться различные аминокислотные остатки. В связи с этим для точного определения варианта вируса в образце требуется детекция одновременно нескольких участков последовательности. Чаще всего это реализуется путем применения нескольких специфических зондов, либо секвенированием полной последовательности S гена. Метод, основанный на технологии пиросеквенирования, позволяет быстро и эффективно разработать систему генотипирования, позволяющую прицельно определять последовательность нескольких полиморфных участков, что необходимо для точного определения варианта коронавируса в образце.

В исследовании использовались образцы коронавирусов SARS-CoV-2, являющиеся представителями вызывающих беспокойство вариантов (VOC, variant of concern) коронавируса (альфа, бета, гамма, дельта, омикрон). Были использованы образцы вирусов, накопленные на клеточной культуре Vero, а также РНК образцов, полученных из мазков из носоглотки человека. Для генотипирования выделяли РНК из образцов вирусов, проводили реакцию ОТ-ПЦР с разработанными в ходе данного исследования специфическими праймерами, после чего проводили пробоподготовку с разделением цепей ДНК на стрептавидиновой сефарозе с помощью вакуумной отмывочной станции в соответствии с рекомендациями производителя. Далее происходило пиросеквенирование с помощью PyroMark Q24 по разработанным в ходе данного исследования протоколам.

Результатом исследования стала апробированная система генотипирования различных вариантов коронавируса на основе ПЦР с определением вариантов методом пиросеквенирования коротких фрагментов при помощи PyroMark Q24. В ходе исследования были разработаны пары праймеров для реакции ПЦР, которые отжигаются на последовательность S-белка разных линий коронавируса, отработаны условия ПЦР. Также были разработаны и апробированы праймеры и протоколы для пиросеквенирования, позволяющие определять последовательность нуклеотидов на кодирующих наиболее функционально значимые аминокислотные замены у разных вариантов коронавируса участках. Разработанные протоколы направлены на определение наиболее эпидемиологически значимых вариантов коронавируса SARS-CoV-2: альфа, бета, гамма, дельта, омикрон.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 21-75-30003.



## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В 2021–2022 ГГ.

Е. В. Яковчук<sup>1,2</sup>, Е. Ю. Шустова<sup>1</sup>, Л. И. Козловская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

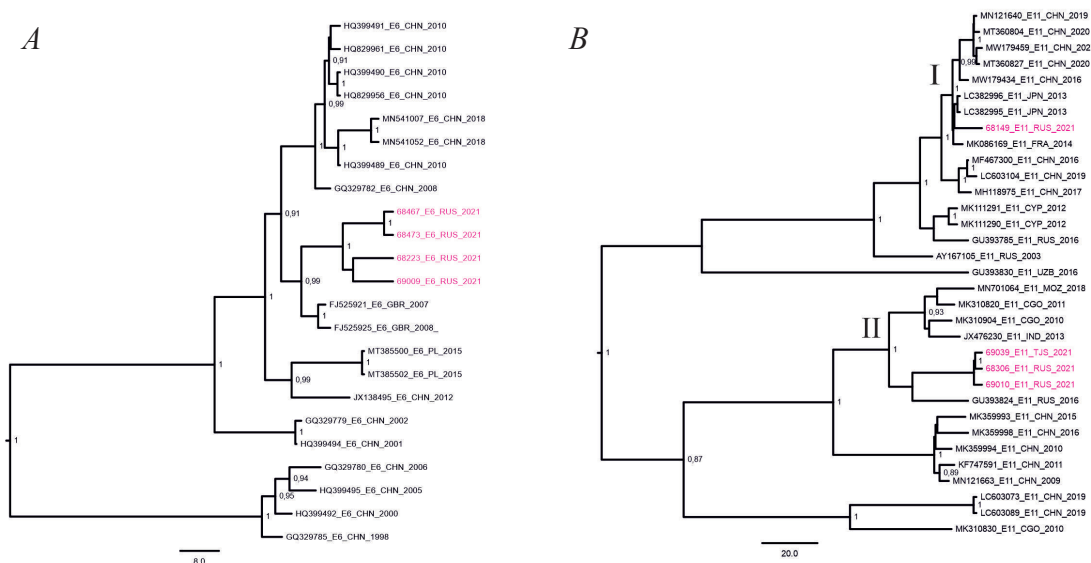
✉ yakovchuklisa@gmail.com

### Аннотация

В данной работе были изучены неполиомиелитные энтеровирусы, выделенные на территории России в 2021–2022 годах. Было генотипировано 185 образцов энтеровирусов, полученных из клинического материала и сточных вод. Проведен филогенетический анализ энтеровирусов вида В, относящихся к типам ЕСНО 6 и ЕСНО 11.

Род *Enterovirus* относится к семейству *Picornaviridae*. Это маленькие РНК-содержащие вирусы, имеющие положительный геном длиной 7 500 нк. К энтеровирусам человека относятся четыре вида — А, В, С и D — включающие более 100 патогенных типов. Энтеровирусная инфекция зачастую протекает бессимптомно, однако при развитии заболевания, в особенности у детей младшего возраста, возможно поражение центральной нервной системы и тяжелые осложнения, такие как серозный менингит, энцефалит, острый вялый паралич. При этом нет возможности привязать определенный тип к конкретному заболеванию. Надзор за циркуляцией неполиомиелитных энтеровирусов рассматривается как важная дополнительная составляющая надзора за полиомиелитом и острыми вялыми параличами. Типирование энтеровирусов осуществляют с использованием серологических и молекулярных методов. Молекулярные методы включают определение нуклеотидной последовательности фрагмента области генома VP1 (2439–3329), кодирующей капсидный белок.

В ходе работы мы исследовали образцы энтеровирусов, выделенных в различных городах Российской Федерации в 2021–2022 годах: 1) от больных, 2) от контактировавших с больными людьми и 3) из сточных вод. Образцы получены по Программе надзора за полиомиелитом и ЭВИ и хранятся в коллекции лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)». Изоляты энтеровирусов пассировали однократно в культуре клеток RD. Типирование энтеровирусов осуществляли при помощи ПЦР фрагмента участка генома VP1 согласно протоколу, предложенному ВОЗ, с последующим секвенированием по методу Сэнгера. Последовательности фрагментов собирали с использованием программы SeqMan пакета DNASTAR. Тип определяли с помощью онлайн-ресурса BLAST. Образцы энтеровируса В были отобраны для дальнейшего филогенетического



Филогенетические деревья с молекулярным датированием энтеровирусов вида В, типов ЕСНО 6 (А) и ЕСНО 11 (В). В узлах указана апостериорная вероятность > 0,85.

Исследуемые образцы выделены розовым цветом

анализа. Для выравнивания последовательностей изучаемых образцов в соответствии с рамкой считывания применяли программы BioEdit v7.0.5.2 и Mega X. Референсные последовательности участка генома VP1 получали из базы данных GenBank. Все отобранные для исследования вирусы отличались по меньшей мере на 1 % нуклеотидной последовательности в области генома VP1. Схожие последовательности были исключены. Построение филогенетических деревьев с использованием молекулярных часов производили с помощью программы BEAST v1.4.8 и вспомогательных приложений (BEAUi v1.5.4).

В результате работы было типировано 185 образцов неполиомиелитных энтеровирусов. Из них 9 % образцов относятся к энтеровирусам вида А, 89 % — к энтеровирусам вида В, и 2 % — к энтеровирусам вида С. Для изучения молекулярной эпидемиологии был произведен филогенетический анализ с молекулярным датированием энтеровирусов 6 и 11. Изучаемые образцы группировались с референсными штаммами в соответствии с их типами. Исследуемые ЕСНО 6 (см. рисунок, А) сгруппировались с образцами из Великобритании и имели общего предка около 19 лет назад (95 % доверительный интервал [15,9–23,3]). Исследуемые образцы ЕСНО 11 разделились на два кластера (см. рисунок, В). В первый кластер вошел образец, выделенный в Санкт-Петербурге, и референсные образцы из Китая, Японии и Франции. Возраст общего предка составляет 16 лет (95 % доверительный интервал [11,3–23,6]). Второй кластер составили образцы, выделенные в Таджикистане и Екатеринбурге, и образцы из Индии, Республики Мозамбик и Демократической Республики Конго, имевшие общего предка около 28 лет назад (95 % доверительный интервал [17,75–44,03]). Это показывает, что данные образцы, скорее всего, были завезены на территорию РФ независимо друг от друга.

## РАЗДЕЛ V

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

## 3D-3-МОДЕЛЬ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СОСТОЯЩАЯ ИЗ ОПУХОЛЕВЫХ, СТРОМАЛЬНЫХ И ИММУННЫХ КЛЕТОК\*

М. М. Абдурахманова<sup>1,2</sup>, С. В. Кулемзин<sup>5</sup>, Т. Н. Беловежец<sup>5</sup>, В. А. Рихтер<sup>1</sup>, О. А. Коваль<sup>1,2</sup>, А. А. Нуштаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>5</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

✉ m.abdurakhmanova98@gmail.com

**Аннотация**

Известно, что микроокружение опухоли играет ключевую роль в прогрессии рака. Микроокружение опухоли состоит из иммунных, стромальных, эндотелиальных клеток и белков внеклеточного матрикса. Получение гетерогенных моделей рака молочной железы (РМЖ) востребовано для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии и исследования межклеточного взаимодействия в канцерогенезе.

Цель исследования состояла в разработке, оптимизации способов культивирования гетерогенной 3D-3-модели рака молочной железы и оценке киллерной активности НК-клеток в составе гетерогенных сфероидов.

Для получения гетерогенных сфероидов РМЖ в качестве опухолевого компонента были выбраны культуры клеток линий MCF-7, MDA-MB-231 и SK-BR-3, в качестве стромального компонента — персональная культура фибробластов BN120f, а в качестве иммунного компонента — НК-подобные клетки линии УТ. Было выбрано две техники получения сфероидов: 1) с использованием Matrigel™ в качестве подложки; 2) с использованием низкоадгезивного пластика в комбинации со средой DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов. Культивирование сфероидов проводили в режиме: 1) моно-культивирования (3D) только опухолевых клеток; 2) со-культивирования опухолевых и стромальных клеток (3D-2); 3) со-культивирования опухолевых, стромальных и иммунных клеток (3D-3).

При высевании суспензии клеток на Matrigel™ показано, что опухолевые клетки формируют 3D-структуры, а гетерогенные 3D-2-сфероиды. В большинстве случаев наблюдались признаки прикрепления к субстрату. При использовании низкоадгезивного пластика Nunclon Sphera в комбинации со средой DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов были получены одиночные сфероиды с возможностью контроля их размера в динамике.

Для визуализации трех типов клеток в совместной 3D-3-модели были получены опухолевые клетки, стабильно экспрессирующие красный флуоресцентный белок mKate2, стромальные клетки, стабильно экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок eGFP и НК-клетки, экспрессирующие синий флуоресцентный белок BFP.

В результате было показано, что стромальные клетки формируют внутренний каркас сфероидов, а опухолевые клетки — их внешний слой. Фибробласты способствуют самоорганизации сфероидов в более плотные и крупные структуры [1].

Для оценки проникновения НК-клеток в опухолево-стромальные сфероиды были приготовлены препараты «давленных сфероидов». Для сфероидов из клеток MDA-MB-231 было показано, что стромальные клетки привлекали НК-клетки внутрь 3D-2-модели, усиливая их цитотоксическую активность, в сравнении с 3D-моделью. В 3D-3-модели из клеток MCF-7, НК-клетки локализовались рядом с популяцией стромальных клеток, без проявления киллерной активности. Проникновение НК-клеток в опухолево-стромальные сфероиды из клеток SK-BR-3 происходило менее эффективно, в связи с крупными размерами сфероидов.

\* Исследование поддержано грантом РФФ № 20-74-10039.

Таким образом, была сконструирована гетерогенная 3D-3-модель рака молочной железы, позволяющая исследовать взаимодействие между опухолевыми, стромальными и иммунными клетками в опухоли.

#### **Литература**

1. Нуштаева А.А., Савинкова М.М., Ермаков М.С., Варламов М.Е., Новак Д.Д., Рихтер В.А., Коваль О.А. Клетки рака молочной железы изменяют чувствительность к гормональным и ростовым стимулам при 3D-культивировании // Цитология. 2022. Т. 64, № 4. С. 1–14.

**ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *TNF* НА СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА\***

С. Н. Адонина, Е. А. Куликова, А. В. Куликов, Д. В. Базовкина

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

✉ sadonina23@gmail.com

**Аннотация**

Фактор некроза опухоли (TNF) — важный модулятор функций центральной нервной системы. Исследован эффект нокаута гена *Tnf* на серотониновую систему мозга после введения липополисахарида (ЛПС, 5 дней, 250 мкг/кг/день) на мышцах линий C57Bl/6 (дикий тип) и C57BL/6-*Tnf*<sup>-/-</sup>. ЛПС усилил метаболизм серотонина в гипоталамусе и среднем мозге только у мышей с нокаутом. Значительного влияния на экспрессию генов ключевых элементов серотониновой системы обнаружено не было.

Многочисленные исследования свидетельствуют о тесном двустороннем взаимодействии между центральной нервной и иммунной системами. Тяжелые психические расстройства часто сопровождаются нарушениями иммунитета, в том числе — повышением уровней провоспалительных цитокинов и их рецепторов в периферической крови и цереброспинальной жидкости. Одним из важных посредников между этими системами является провоспалительный цитокин — фактор некроза опухоли (*tumor necrosis factor*, TNF). Нокаут животных по какому-либо гену является удобной моделью для изучения роли продукта этого гена в жизнедеятельности организма. Есть немногочисленные несколько противоречивые данные о влиянии нокаута гена *Tnf* на тревожность, депрессивноподобное поведение и уровень нейромедиатора серотонина (5-НТ) в мозге. Однако до сих пор не было изучено, какую роль может играть дефицит гена *Tnf* в механизмах воспалительного действия ЛПС на 5-НТ систему мозга.

Целью данной работы было исследование влияния нокаута гена, кодирующего TNF, на 5-НТ систему мозга у мышей после длительного введения ЛПС. Для этого в структурах мозга самцов мышей дикого типа (WT, линия C57Bl/6) и нокаутных по гену *Tnf* (линия C57BL/6-*Tnf*<sup>-/-</sup>, TNF KO) были изучены 1) уровни мРНК генов, кодирующих ключевые элементы 5-НТ системы мозга: ТПГ2, 5-НТТ, IDO, 5-НТ1А, 5-НТ2А и 5-НТ7 рецепторы, 2) содержание 5-НТ и его метаболита 5-ГИУК (5-гидроксииндолуксусной кислоты) после продолжительного введения бактериального липополисахарида (ЛПС, 5 дней, 250 мкг/кг/день, внутривентриально). Экспрессию генов оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни 5-НТ и 5-ГИУК в структурах мозга исследовали методом ВЭЖХ. Результаты обрабатывали двухфакторным ANOVA (факторы «генотип» и «препарат») с последующим межгрупповым сравнением методом LSD по Фишеру.

Нокаут гена *Tnf* приводил к повышению уровня мРНК гена *Ido1* ( $p < 0,05$ ) во фронтальной коре и снижению уровня мРНК гена *Htr2a* ( $p < 0,05$ ) в среднем мозге. У мышей обеих линий ЛПС не оказал действия на экспрессию ключевых для серотониновой системы мозга генов *Htr1a*, *Htr2a*, *Htr7*, *Trh2* и *Slc6a4*, кодирующих серотониновые рецепторы 5-НТ1А, 5-НТ2А, 5-НТ7, триптофангидроксилазу 2 (фермент синтеза 5-НТ в мозге) и транспортер серотонина, соответственно. Однако было найдено, что введение липополисахарида снижало уровень мРНК гена *Ido1* ( $p < 0,05$ ), кодирующего индоламин-2,3-деоксигеназу (фермент альтернативного пути метаболизма L-триптофана, предшественника серотонина) во фронтальной коре самцов линии TNF KO. Нокаут гена *Tnf* приводил к повышению уровня серотонина во фронтальной коре ( $p < 0,05$ ), гиппокампе и среднем мозге. В результате введения бактериального эндотоксина индекс метаболизма серотонина (5-ГИУК/серотонин) повышался для гипоталамуса ( $p < 0,05$ ) и среднего мозга ( $p < 0,05$ ) только у мышей линии TNF KO.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии нокаута гена *Tnf* на чувствительность серотониновой системы мозга к введению воспалительного агента.

\* Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-15-00051).  
© С. Н. Адонина, Е. А. Куликова, А. В. Куликов, Д. В. Базовкина, 2022

## ДЕКСАМЕТАЗОН ВЛИЯЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

С. Д. Аладьев, М. О. Политко, Д. К. Соколов, Э. В. Григорьева

*Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск\**

✉ s.aladev@alumni.nsu.ru

### Аннотация

Глюкокортикоиды (ГК) — это природные или синтетические препараты, которые оказывают иммунорегулирующее, противовоспалительное и антиаллергическое действие и применяются при лечении множества заболеваний, таких как глиобластома, острый лимфобластный лейкоз, аутоиммунная гемолитическая анемия, лимфома Ходжкина, а с недавнего времени и при терапии COVID-19. Показано, что ГК вызывают различные побочные эффекты при длительном применении и при высоких дозах. Известно, что действие ГК реализуется через глюкокортикоидный рецептор (GR), экспрессия которого кодируется геном NR3C1, однако молекулярные механизмы действия ГК на экспрессию GR в ткани головного мозга не до конца изучены. В данной работе показано, что даже однократное применение дексаметазона способно изменять уровень экспрессии глюкокортикоидного рецептора в ткани головного мозга мышей, и этот эффект зависит от исходного уровня экспрессии GR у каждого конкретного животного.

Современные препараты ГК обладают выраженным иммунорегулирующим и противовоспалительным действиями, наряду с низкой минералкортикоидной активностью, а синтетические ГК препараты (например, дексаметазон) применяются при лечении опухолей головного мозга — глиом, в том числе глиобластомы. Молекулярные механизмы действия ГК хорошо изучены, однако существует мало исследований в области влияния ГК на экспрессию GR (ген NR2C1) в нормальной и патологической ткани головного мозга.

Цель данного исследования заключалась в изучении эффекта влияния глюкокортикоида дексаметазона на экспрессию GR в ткани головного мозга экспериментальных животных.

Краткосрочные эффекты однократного введения различных доз дексаметазона (DEX) (0,1; 1; 2,5 и 10 мкг / кг веса животного) изучали на мышах линии C57Bl/6 (115 самцов, возраст 7–8 недель), которые выводились из эксперимента на 1, 3, 7 и 10 дни после введения дексаметазона. Уровень экспрессии GR в ткани головного мозга определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени и нормировали на уровень экспрессии гена Gapdh.

Было обнаружено, что интактные животные различаются по экспрессии GR и могут быть условно разделены на 2 подгруппы с условно-низким и условно-высоким уровнем экспрессии GR ( $\pm 9$  и  $\pm 20$ ,  $p < 0,05$ , ANOVA) (относительно медианного значения). Введение дексаметазона влияло на экспрессию GR в ткани головного мозга мышей, а изменения наступали быстро — в течение 1–3 суток. При этом дексаметазон по-разному влиял на ткань головного мозга животных с низкой и высокой базовой экспрессией GR, а именно: уровень экспрессии GR в тканях с низкой экспрессией повышался в 1,5–2 раза на 1–3 сутки после однократного введения дексаметазона и плавно снижался к уровню контроля на 7–10 сутки; в то же время экспрессия GR в тканях с высокой экспрессией в течение 1–3 суток не изменялась и снижалась в 2 раза на 7–10 сутки ( $p < 0,05$ , ANOVA). Показанные изменения возникают уже при введении минимальной дозы дексаметазона (0,1 мг / кг), а ее повышение не приводило к принципиальным изменениям.

Согласно полученным результатам, однократное воздействие дексаметазона на ткань головного мозга мышей приводит к быстрому изменению уровня экспрессии GR в головном мозге животных с низкой базовой экспрессией GR, который возвращается к нормальному показателю на 7–10 день после введения препарата. У животных с высоким базовым уровнем экспрессии GR введение дексаметазона не приводит к его дальнейшему повышению, хотя на 7–10 день также наблюдается снижение экспрессии GR до уровня, характерного для животных с низкой базовой экспрессией GR. Дальнейшие эксперименты в данной области являются крайне многообещающими, поскольку взаимосвязь экспрессии GR в ткани головного мозга с применением ГК позволит выявить новый молекулярный механизм действия ГК и внесет свой вклад в понимание терапевтических и побочных эффектов действия глюкокортикоидных препаратов.

## РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНКАЗА УМЕНЬШАЕТ КОЛИЧЕСТВО МЕТАСТАЗОВ И ИЗМЕНЯЕТ ПРОФИЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК КРОВИ\*

Л. А. Алексеева, А. В. Сенькова, М. А. Зенкова, Н. Л. Миронова

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

✉ mila\_alex@ngs.ru

### Аннотация

Во многих исследованиях сообщалось об увеличении уровня циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови онкологических больных. ВкДНК в основном происходит из опухолевых клеток и, следовательно, несет черты своего геномного профиля. Избыточные вкДНК опухолевого происхождения могут представлять угрозу, вызывая воспаление, а также проникать в клетки уязвимых органов, изменяя их фенотип, способствуя формированию премеастатических ниш. Другим источником вкДНК являются иммунные клетки, в том числе нейтрофилы, которые генерируют нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs). Несмотря на потенциальные противоопухолевые свойства NETs, в ряде случаев их избыточная генерация способствует росту и инвазии опухоли. Принимая во внимание как возможный патологический вклад вкДНК как агента онкотрансформации, так и основного компонента NETs, изучение дезоксирибонуклеаз (ДНКаз) как противораковых и антимеастатических агентов является важным и перспективным.

Рекомбинантная человеческая ДНКаз I (коммерческое название Пульмозим), которая используется для лечения муковисцидоза, была перепрофилирована для ингибирования метастазов в легких на модели мышинной меланомы B16. Было обнаружено, что рекомбинантная ДНКаз значительно снижает миграцию и индуцирует апоптоз клеток B16 *in vitro* и эффективно ингибирует метастазы в легких и печени *in vivo*. Показано, что рекомбинантная ДНКаз более эффективна при интраназальном (и/н) введении по сравнению с внутримышечным (в/м) введением. Лечение рекомбинантной ДНКазой повышало патологически сниженную ДНКазную активность сыворотки крови до уровня здоровых животных, а также приводило к снижению концентрации вкДНК. Под действием рекомбинантной ДНКазы происходило расщепление преимущественно опухоли-ассоциированных последовательностей: избыточных тандемных повторов и мобильных генетических элементов (SINE и LINE), онкогенов (Myc), что приводило к нормализации профиля вкДНК и приближению его к профилю здоровых животных. Образование NETs не было зафиксировано, так как нейтрофильная активность не характерна для поздних этапов развития мышинной метастатической меланомы. Кроме того, было замечено, что лечение рекомбинантной ДНКазой индуцировало апоптоз в метастатических очагах, что также может препятствовать распространению метастазов. Таким образом, рекомбинантная человеческая ДНКаз I в виде препарата Пульмозим, который уже является клинически одобренным препаратом, может быть рекомендован для лечения метастазов в легких.

\* Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ 19-74-30011, РФФИ 22-14-00289 и российского государственного проекта для ИХБФМ СО РАН (номер гранта 121031300044-5).

© Л. А. Алексеева, А. В. Сенькова, М. А. Зенкова, Н. Л. Миронова, 2022

## АНТИМИКРОБНЫЕ, ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ МОНО- И ДИКАТИОННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

С. К. Амерханова<sup>1</sup>, А. Д. Волошина<sup>1</sup>, А. Б. Миргородская<sup>1</sup>, В. А. Михайлов<sup>2</sup>, Л. Я. Захарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН

<sup>2</sup>Институт физико-органической химии и углехимии им. Л. М. Литвиненко, Донецк

✉ syumbelya07@mail.ru

### Аннотация

На сегодняшний день большой научный интерес вызывают катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ), содержащие имидазолиевый фрагмент. Эти соединения способны взаимодействовать и образовывать комплексы со многими белковыми молекулами, нуклеиновыми кислотами и действующими веществами лекарственных препаратов [1]. Благодаря этому эти ПАВ демонстрируют высокую антимикробную активность против широкого спектра патогенных микроорганизмов [1, 2].

В работе впервые была исследована антимикробная и токсическая активность дикатионных имидазолиевых ПАВ и их монокатионных аналогов.

Соединения проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамположительных, грамотрицательных бактериальных и грибных патогенов. Самыми активными оказались дикатионные ПАВ с децильными и додецильными радикалами. В то время как их монокатионные аналоги не характеризовались столь высокой активностью. Соединения-лидеры по своей активности значительно превышали действие эталонных антибиотиков и оказались эффективными против метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* [2].

Механизм антимикробной активности веществ изучали методами витального окрашивания бактерий набором LIVE/DEAD и оценкой поглощения клетками красителя кристаллического фиолетового (CV). Было показано, что соединения-лидеры обладают выраженной дозозависимой мембранотропной активностью. При помощи системы Zetasizer Nano ZSP было исследовано воздействие ПАВ на морфологию *S. aureus*. В экспериментах наблюдали значительное уменьшение размеров бактериальных клеток.

Биопленки являются одним из патогенетических факторов формирования хронических инфекционных процессов, так как в составе биопленок микробные агенты легче и быстрее формируют устойчивость к антимикробным препаратам. В связи с этим было изучено влияние ПАВ на биопленкообразование. В ходе опыта было показано, что соединения-лидеры не только подавляют рост биопленок золотистого стафилококка, но и вовсе приводят к их полному уничтожению.

Важнейшим показателем при разработке новых антимикробных веществ являются исследования вероятности возникновения к ним резистентности у микробов. Бактериальные клетки не вырабатывали устойчивость к соединениям-лидерам на протяжении всего эксперимента, в то время как резистентность сформировалась ко многим группам антимикробных препаратов.

Соединения-лидеры проявляли умеренную токсичность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и не обладали мутагенным действием.

Полученные результаты позволяют рассматривать протестированные соединения в качестве основы для направленного дизайна биоактивных поверхностно-активных соединений, используемых в разработке новых потенциальных антимикробных агентов.

### Литература

1. Bhadani A., Misono T., Singh S., Sakai K., Sakai H., Abe M. Structural diversity, physicochemical properties and application of imidazolium surfactants: Recent advances // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2016. V. 231. P. 36–58.
2. Voloshina A. D., Gumerova S.K., Sapunova S., Kulik N.V., Mirgorodskaya A.B., Kotenko A.A., Prokopyeva T.M., Mikhailov V.A., Zakharova L.Ya., Sinyashin O.G. The structure–activity correlation in the family of dicationic imidazolium surfactants: Antimicrobial properties and cytotoxic effect // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects*. 2020. V.1864. P.129728.



## БИОЛОГИЯ ТЕЛОМЕР И ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЛЕГКОГО

М. А. Асанов<sup>1</sup>, А. В. Понасенко<sup>1</sup>, В. И. Минина<sup>2</sup><sup>1</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово<sup>2</sup>Кемеровский государственный университет

✉ asmaks988@gmail.com

**Аннотация**

Геномная нестабильность является важным признаком почти всех видов рака человека и активно исследуется для детального понимания биологии рака. Изменение длины теломерных участков ДНК может вызывать хромосомную нестабильность. Возможно совместное использование микроядерного теста и методов оценки биологии теломер в качестве биомаркеров геномной нестабильности у пациентов с раком легкого.

Рак легкого (РЛ) представляет собой один из наиболее часто диагностируемых видов злокачественных новообразований легочной и бронхиальной ткани и ведущей причиной смерти от заболеваний такого типа во всем мире [1]. Нестабильность генома является важным признаком почти всех видов рака человека, и изучение в этом направлении биологии рака активно развивается в настоящее время [2].

Цель настоящего исследования — определить признаки геномной нестабильности при РЛ с коморбидной сердечно-сосудистой патологией посредством использования микроядерного теста и относительной длины теломер (ОДТ), уровня экспрессии гена hTERT методом кПЦР.

**Частота обнаружения двуядерных лимфоцитов с микроядрами, мостами и протрузиями (Me±QR)**

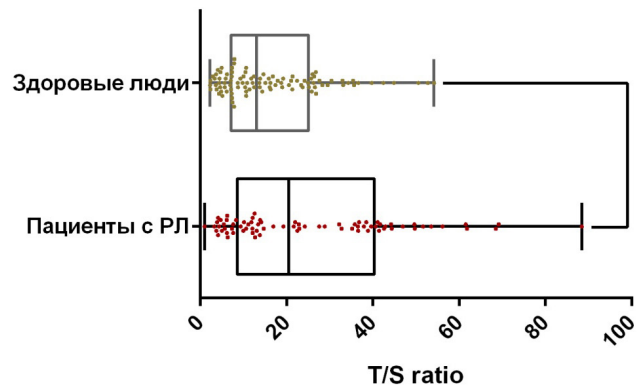
Двуядерные лимфоциты	Больные раком лёгкого (n = 80)	Контрольная группа (n = 100)
с 1 МЯ	1,3±0,6	0,6±0,3*
с 2 МЯ	0,1±0,2	0±0,1*
всего с МЯ	1,3±0,8	0,7±0,2*
с протрузией	1,5±1,17	1,7±0,6
с нуклеоплазменным мостом	0,40±0,37	0,2±0,2*

Примечание. МЯ — микроядро; n — количество; \* —  $p < 0,05$ .

В группу исследования включены 80 мужчин с диагностированным раком легкого, в контрольную группу — 100 мужчин без онкопатологии близкого возраста, проживающие в той же местности. На лимфоцитах крови выполняли микроядерный тест. Длина теломерных участков ДНК и уровень экспрессии hTERT оценивались при помощи количественной полимеразной реакции.

В результате отмечено увеличение частоты встречаемости маркеров цитогенетических нарушений при раке легкого. Нами установлено, что частота встречаемости двуядерных лимфоцитов пациентов с РЛ с одним, двумя и общим количеством МЯ (табл.) почти вдвое превышает аналогичные показатели здоровых людей ( $p < 0,05$ ). Также выявлено двукратное превышение двуядерных лимфоцитов с нуклеоплазменным мостом в группе больных онкологией ( $p < 0,05$ ). Однако количество двуядерных лимфоцитов с протрузией здоровых людей незначительно преобладали над данным показателем группы исследования, но статистически значимые различия отсутствовали ( $p > 0,05$ ). ОДТ контрольной группы в 1,6 раза короче ОДТ лимфоцитов группы РЛ ( $p > 0,05$ , см. рисунок). Ген hTERT не экспрессировался.

Геномная нестабильность является одной из отличительных черт онкологии человека, приводящая к различным генетическим абберациям на различном уровне от мутаций в одиночных или нескольких нуклеотидах до изменений части или целых хромосом, в том числе изменения длины теломер [3]. Полученные результаты продемонстрировали возможность совместного микроядерного теста и методов оценки биологии теломер



Сравнение относительной длины теломер

в качестве биомаркеров геномной нестабильности в лимфоцитах периферической крови человека у пациентов с РЛ.

#### **Литература**

1. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: cancer today. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today>, 2020
2. Li L., Zhang X., Tian T., Pang L. Mathematical modelling the pathway of genomic instability in lung cancer // *Sci Rep.* 2019. V. 9(1). P. 14136. doi: 10.1038/s41598-019-50500-w.
3. Zito Marino F., Bianco R., Accardo M., et al. Molecular heterogeneity in lung cancer: from mechanisms of origin to clinical implications // *Int J Med Sci.* 2019. V. 16(7). P. 981-989. doi: 10.7150 / ijms.34739

## ОБРАЗОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ СО СПЕЦИФИЧНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ К БЕЛКУ МИЕЛИНА В МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА ЧЕЛОВЕКА\*

К. С. Аулова<sup>1</sup>, Г. А. Невинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ k.aulova@alumni.nsu.ru

### Аннотация

У трансгенных мышей линий Th и 2D2 со специфичными к пептиду миелина рецепторами на В- и Т-лимфоцитах при развитии экспериментального энцефаломиелимита, модели рассеянного склероза человека, происходит перестройка иммунной системы. Показано, что повышается образование аутоантител к белкам миелина, ДНК и гистонам, а также каталитических антител, способных гидролизовать данные антигены.

Миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (МОГ) — белок центральной нервной системы, необходимый для поддержания структуры миелиновой оболочки. Так как один из доменов МОГ расположен на поверхности миелина, аутореактивный ответ на данный белок может приводить к разрушению миелиновой оболочки, и, соответственно, к заболеваниям, сопровождающимся демиелинизацией аксонов. Одним из таких заболеваний является рассеянный склероз.

Взаимодействие иммунной системы и миелина исследованы на моделях, в частности, на различных линиях мышей. Аналогом рассеянного склероза человека традиционно считают экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) мышей, схожий по симптоматике и патологическим механизмам. Чаще всего ЭАЭ индуцируют иммунизацией пептидами миелина, в том числе пептидом МОГ<sub>35-55</sub> в сочетании с адъювантами и соединениями, нарушающими гематоэнцефалический барьер. Однако разрабатывают и трансгенные линии животных, у которых развитие заболевания происходит спонтанно, а процессы более полно отражают развитие рассеянного склероза человека.

Примером таких моделей являются трансгенные линии со специфичными рецепторами к МОГ<sub>35-55</sub>, созданные на основе линии C57BL/6 — Th с трансгенным В-клеточным рецептором и 2D2 с Т-клеточным рецептором. В различных исследованиях данных линий было показано, что в процесс взаимной активации аутоиммунного ответа на белки миелина вовлечены не только эффекторные Т-клетки, но и В-клетки, а также антитела к МОГ, участвующие в демиелинизации аксонов. Ранее мы показали, что при спонтанном или индуцированном иммунизацией развитии ЭАЭ у мышей C57BL/6 происходят изменения в профилях дифференцировки гемопоэтических клеток костного мозга, уровне апоптоза лимфоцитов и их пролиферации, что приводит к повышению в крови уровней аутоантител к белкам миелина, ДНК и гистонам, а также каталитических антител, гидролизующих данные антигены.

В данной работе мы исследовали параметры спонтанного развития экспериментального энцефаломиелимита у самцов и самок мышей трансгенной линии 2D2. Полученные данные сравнивали с параметрами у мышей линий C57BL/6, склонных к развитию ЭАЭ, и мышей линии Th.

Показано, что для каждой линии в эксперименте были характерны различные профили дифференцировки гемопоэтических клеток костного мозга: наблюдали и общие, и противоположные тенденции изменения в различные точки времени, в том числе для самцов и самок одной линии. Процентные содержания популяций Т- и В-лимфоцитов в крови и различных органах (костный мозг, селезенка, лимфатические узлы, тимус) также имели различные профили во времени.

Впервые показано, что концентрация аутоантител к МОГ<sub>35-55</sub>, основному белку миелина, ДНК и гистонам в крови особей линии 2D2 в целом была ниже, чем у самцов линии C57BL/6. При этом у самцов линии 2D2 титр антител к МОГ<sub>35-55</sub> был выше, чем у самцов и самок Th со специфичным В-клеточным рецептором к данному пептиду, но относительная активность антител в гидролизе МОГ<sub>35-55</sub> у линии 2D2 была сопоставима с активностью антител особей Th до 40-го дня эксперимента и ниже ее к 70-му дню эксперимента. Также при небольших титрах антител против ДНК и основному белку миелина в крови особей 2D2 относительная активность антител в гидролизе данных субстратов была выше, чем у мышей линий Th и C57BL/6 на протяжении всего эксперимента.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00103).

**DETECTION OF MUTATIONS IN *RPOB* GENE OF RIFAMPICIN-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF *M. TUBERCULOSIS* FROM KAZAKHSTAN\***

A. Akhmetova<sup>1,2</sup>, A. Chamoieva<sup>1</sup>, Zh. Abilova<sup>1</sup>, A. Kassymkhanova<sup>1</sup>, A. Akilzhanova<sup>1,2</sup>, U. Kozhamkulov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Genomic and Personalized Medicine, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan, Kazakhstan

<sup>2</sup>Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

✉ ainur.akhmetova2@nu.edu.kz

**Abstract**

The number of multidrug-resistant tuberculosis is increasing every year in Kazakhstan. Rifampicin is one of the most effective first-line anti-tuberculosis drugs and a main factor in deciding the treatment effectiveness of the treatment regimens. According to the publications, 95 % of rifampicin resistant isolates have mutations in 81-bp hot-spot region (codons 507 to 533) of *rpoB* gene. Aim of this study is to determine mutations in the hot-spot region of *rpoB* gene among rifampicin-resistant *M. tuberculosis* isolates from Kazakhstan.

122 rifampicin-resistant isolates from various regions of Kazakhstan were analyzed in this study. Resistance of *M. tuberculosis* isolates to rifampicin was estimated by absolute concentration method in the Reference Laboratory of National Scientific Center for Phthisiopulmonology (Almaty, Kazakhstan). Mutations in *rpoB* gene associated with resistance to rifampicin was detected using ABI 3730 DNA Analyzer (Applied BioSystems, USA). Obtained sequencing data was analyzed by Lasergene program (DNASTar). *M. tuberculosis H37Rv* reference strain was used as a control.

In the result of sequencing, mutations at 4 codons were found in the hot-spot region of *rpoB* gene among Kazakhstani rifampicin-resistant *M. tuberculosis* isolates. Most of the clinical isolates (85.3 %, n = 104) revealed Ser531Leu mutation at codon 531 of *rpoB* gene. 9 % of *M. tuberculosis* isolates (n = 11) had the mutation at codon 526 of the gene, amino acid substitution of His526Arg. Two clinical isolates (1.6 %) showed 2 different amino acid changes at codon 516 of *rpoB* gene — Asp516Val and Asp516Tyr, respectively. Leu533Pro mutation at codon 533 was identified in 0.8 % cases (n = 1) and the rest of 3.3 % isolates (n = 4) did not reveal any mutations in *rpoB* gene.

Determination of mutations in *rpoB* gene associated with rifampicin resistance among drug-resistant *M. tuberculosis* isolates in Kazakhstan is important. Mutation at codon 531 (Ser531Leu) of *rpoB* gene prevailed among rifampicin-resistant *M. tuberculosis* clinical isolates (85.3 %) in our research and no mutations were found in 4 clinical isolates (3.3 % cases).

\* This study was supported by Grant 11022021CRP1511 and Grant AP09259750.

## ПОИСК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ МИКОБАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩЕЙ В ОБРАЗОВАНИИ ТЕТРАМЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ КОПРОПОРФИРИНА \*

Д. И. Багаева, Г. Р. Демина, В. Д. Никитушкин, А. С. Капрельянц, М. О. Шлеева

Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

✉ багаева115@mail.ru

### Аннотация

Исследование посвящено изучению молекулярных механизмов перехода микобактерий в состояние покоя. В работе были получены рекомбинантные метилтрансферазы микобактерий и оценена их способность метилировать копропорфирин с образованием тетраметилового эфира.

Микобактерии, как известно, способны переходить в покоящееся состояние, характеризующееся резким снижением метаболической активности, устойчивостью к повреждающим воздействиям и отсутствием деления. Такой переход *Mycobacterium tuberculosis* связывают с развитием латентного туберкулеза, который трудно поддается диагностике и лечению. В связи с этим, изучение особенностей биохимии покоящихся микобактерий является актуальным для медицинской микробиологии. Ранее было выявлено, что при переходе быстрорастущего родственника возбудителя туберкулеза *Mycobacterium smegmatis* в состояние покоя, происходит внутриклеточное накопление порфиринов, представляющих собой смесь копропорфирина III, уропорфирина III и, особенно тетра-метилового эфира копропорфирина [1]. Предположительно, порфирины, накапливаясь в мембранах микобактерий, способствуют развитию устойчивости покоящихся клеток микобактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды (в частности, за счет стабилизации компонентов мембран). В настоящее время неизвестен фермент, участвующий в метилировании копропорфирина и образовании его тетра-метилового эфира. Обнаружение гидрофобной, полностью метилированной формы порфирина у покоящихся микобактерий, в отличие от вегетативных клеток, означает наличие специфической реакции метилирования, происходящей при переходе бактерий в состояние покоя.

**Целью** данной работы было получение восьми предполагаемых метилтрансфераз: MSMEG\_0954, MSMEG\_2618, MSMEG\_3877, MSMEG\_3873, MSMEG\_0614, MSMEG\_6284, MSMEG\_3041, MSMEG\_5353, и исследование их способности метилировать копропорфирин с образованием тетраметилового эфира.

Для реализации поставленной цели было проведено клонирование генов, кодирующих метилтрансферазы, в вектор pET23a. Конструкции трансформировали в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3). Как промежуточные, так и итоговые генетические конструкции были проверены методами ПЦР и секвенирования. Выделение и очистку белка проводили с использованием металлохелатной хроматографии. Чистоту рекомбинантных белков оценивали электрофорезом в 12 % полиакриламидном геле и иммуноблотом с анти-His-Tag антителами, подтверждали методом MALDI.

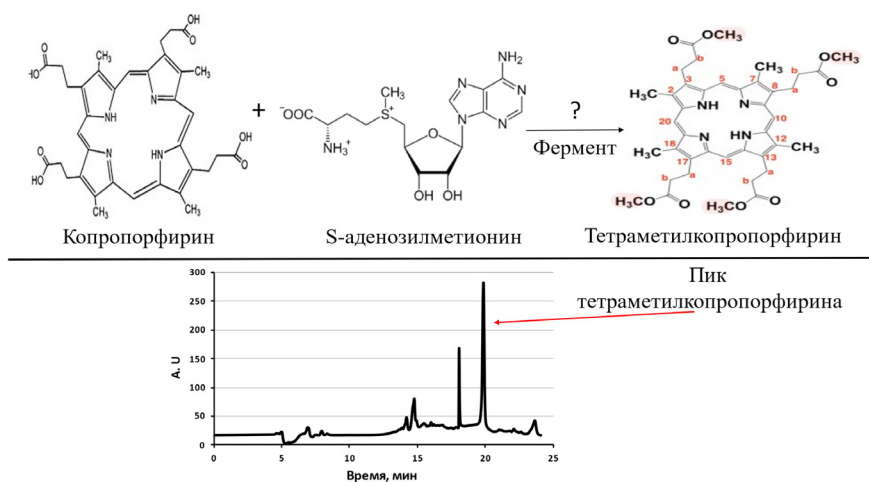


Схема метилирования копропорфирина предполагаемой метилтрансферазой и хроматограмма ВЭЖХ продуктов данной реакции в случае образования тетраметилового эфира

\* Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-15-00324.

Полученные рекомбинантные белки были оценены по их способности катализировать реакцию метилирования копропорфирина с участием в качестве субстрата S-аденозил-метионина по схеме, изображенной на рисунке. Продукты реакции анализировали методом ВЭЖХ.

Поскольку чистые рекомбинантные белки в реакционной смеси не проявили активности в отношении образования гидрофобного тетраметилового эфира копропорфирина, была выдвинута гипотеза о том, что для эффективного функционирования исследуемых метилтрансфераз необходимы кофакторы, отсутствующие в реакционной смеси с рекомбинантными белками. Для проверки данной гипотезы были исследованы лизаты клеток *E.coli* с гиперэкспрессией изучаемых белков (BL\_MSMEG\_0614; BL\_MSMEG\_0954; BL\_MSMEG\_2618; BL\_MSMEG\_3041; BL\_MSMEG\_3873; BL\_MSMEG\_3877; BL\_MSMEG\_5353; BL\_MSMEG\_6284). Было выявлено, что белок MSMEG\_0614 демонстрирует полную конверсию копропорфирина в соответствующее триметильное и тетраметильное производное. А также наблюдалось появление пика, соответствующего тетраметиловому эфиру копропорфирина, с низкой интенсивностью в отношении белка MSMEG\_0954. Согласно программе BLAST аналогичные белки имеются и у *M. tuberculosis* (Rv0281 и Rv0511).

Таким образом, нам впервые удалось выявить ранее не описанную специфическую метилтрансферазу *M. smegmatis*, способную переносить метильные остатки на карбоксильные группы копропорфирина.

### Литература

1. Nikitushkin V.D., Shleeva M.O., Zinin A.I. [et al.] The main pigment of the dormant Mycobacterium smegmatis is porphyrin// FEMS Microbiology Letters. 2016. V. 363. fnw206.

## ПРОФИЛИРОВАНИЕ МИКРОРНК В ЛИКВОРЕ ПАЦИЕНТОВ С ТРАВМАТИЧЕСКИМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ СПИННОГО МОЗГА\*

И. А. Байчурина<sup>1</sup>, И. А. Шульман<sup>2</sup>, С. В. Огурцов<sup>2</sup>, М. И. Маркелова<sup>1</sup>, Я. О. Мухамедшина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup>Республиканская клиническая больница, Казань

✉ baich.rina@mail.ru

### Аннотация

С помощью высокопроизводительного секвенирования проведено профилирование ликвора людей с травмой спинного мозга. В работе отмечены динамические изменения профиля микроРНК после травмы.

### Введение

Несмотря на длительный период исследований неврологических нарушений, до сих пор остаются не решенными вопросы, касающиеся молекулярных механизмов течения данных заболеваний и поиска эффективных биомаркеров для ранней постановки диагноза, прогнозирования исхода или терапевтического вмешательства. Особо остро эти вопросы звучат при исследовании травмы спинного мозга (ТСМ). Нейрорегенераторный потенциал ЦНС достаточно низкий, тем не менее, части пациентов с ТСМ удается полностью или частично восстановить утраченные функции [1]. Считается, что изменения экспрессии генов, связанные с процессами, запускаемыми ТСМ, сопровождаются посттранскрипционной регуляцией генов. Среди известных посттранскрипционных регуляторов наибольшее значение имеют микроРНК [2]. В качестве источника биомаркеров рассматривается ликвор, так как он находится в прямом контакте с центральной нервной системой и может содержать биомаркеры, свидетельствующие о повреждениях спинного мозга. Изучение профиля микроРНК в ликворе в норме и при нейротравме является актуальным исследованием. Поскольку концентрация микроРНК в ликворе низкая, их экстракция является сложной задачей. Целью работы было сравнить профили микроРНК в ликворе пациентов с ТСМ в острый и подострый периоды и контрольной группы условно-здоровых добровольцев.

### Материалы и методы

Образцы ликвора объемом до 3 мл были взяты с помощью люмбальной пункции на третьи и на седьмые сутки после поступления пациентов с ТСМ в нейрохирургическое отделение № 2 Республиканской клинической больницы (Казань, Россия). В качестве контроля был взят ликвор от пациентов без травмы. Всего было исследовано 12 пациентов по 4 человека в каждой группе. Тотальная РНК выделена из 1,5 мл ликвора методом фенол-хлороформной экстракции с помощью TRIzol LS Reagent с модификациями протокола производителя. Содержание микроРНК в образцах с тотальной РНК определялось с помощью набора реагентов Bioanalyzer Small RNA kit. Библиотеки для секвенирования были подготовлены с применением SEQuoia Complete Stranded RNA library prep kit. Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе Illumina NextSeq 500. Биоинформатический анализ проводился с применением SEQuoia RNA library.

### Результаты

Было установлено статистически достоверное изменение экспрессии для 17 микроРНК в острый период ТСМ по сравнению с контрольной группой. Дифференциальная экспрессия наблюдалась для 75 микроРНК при сравнении пациентов в подострый период с контрольной группой.

Наибольшие изменения были обнаружены для hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-145-5p и hsa-miR-130a-3p, их экспрессия снижалась у пациентов в острый период ТСМ на третьи сутки в 64 раза, и наблюдалось дальнейшее снижение экспрессии на седьмые сутки по сравнению с контрольной группой. Перечисленные микроРНК могут участвовать в различных сигнальных путях: канцерогенез различных типов рака, сигнальный путь регуляции плюрипотентных стволовых клеток, сигнальный путь ErbB и другие. Ранее было установлено, что элементы сигнального пути TGF- $\beta$  способны участвовать в реакциях после ТСМ. Также отмечено уменьшение экспрессии hsa-miR-195-5p, hsa-miR-30a-3p в 32 раза в острый период по сравнению контролем. Указанные микроРНК участвуют в клеточном цикле, а также в развитии различных типов рака. В подострый период мы также наблюдали увеличение экспрессии MIR3648-2, которая, как показано ранее, может участвовать в регуляции пролиферации клеток [3].

\* Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (№0671-2020-0058).

**Выводы**

Для дальнейшего использования микроРНК в качестве биомаркеров при ТСМ планируется провести более глубокие исследования: добавить динамические точки, увеличить когорту пациентов, валидировать полученные данные секвенирования с помощью ПЦР в режиме реального времени, а также сопоставить полученные данные с анамнезом.

**Литература**

1. Steeves J. D., Kramer J. K., Fawcett J. W., Cragg J., Lammertse D. P., Blight A. R., et al. Extent of spontaneous motor recovery after traumatic cervical sensorimotor complete spinal cord injury // *Spinal Cord*. 2011. V. 49. P. 257-265.
2. Pinchi E., Frati A., Cantatore S., D'Errico S., La Russa R., Maiese A., et al. Acute spinal cord injury: a systematic review investigating miRNA families involved. *International Journal of molecular sciences* // 2019. V. 20. P. 1841.
3. Rashid F., Awan H.M., Shah A., Chen L., Shan G. Induction of miR-3648 Upon ER Stress and Its Regulatory Role in Cell Proliferation. *International Journal of molecular sciences* // 2017. V.18. P.1375.



## ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ХРОСОМОНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *TP53*\*

И. Н. Бакланов, Н. В. Гончаров, Д. В. Ланских

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

✉ che1p4uk@gmail.com

### Аннотация

Онкологические заболевания характеризуются возникновением хромосомной нестабильности, которая является следствием полиморфизмов онкогенов и развивается спустя десятки клеточных делений после возникновения первичной драйверной мутации. Ключевой идеей исследования является возможность оценки вклада драйверных мутаций в развитие опухоли путем определения уровня хромосомной нестабильности при гиперэкспрессии полиморфных вариантов онкогенов.

Как известно, хромосомная нестабильность (ХН) характеризуется постоянными перестройками в структуре хромосом и индуцируется нарушением их сегрегации в митозе. ХН приводит к кариотипическому разнообразию в популяции раковых клеток, тем самым усиливая внутриопухольевую гетерогенность. Возможно, самым примечательным наблюдением о роли ХН в развитии онкологических заболеваний является ее парадоксально негативное влияние на жизнеспособность клеток *in vitro* и *in vivo* [1, 2]. Именно поэтому опухоли должны выработать механизмы невосприимчивости к ХН, тем самым обеспечив свое выживание. Таким образом, механизмы невосприимчивости позволяют раковым клеткам пережить события неправильной сегрегации хромосом и создать достаточное кариотипическое разнообразие в популяции. Имеется огромное количество генетических и функциональных доказательств, связывающих мутации в опухолевом супрессоре *TP53* с невосприимчивостью к ХН [3].

Данная работа направлена на разработку клеточной модели для оценки вклада онкогенов с драйверными мутациями в процесс формирования хромосомной нестабильности (рис. 1). Классическим примером высоко полиморфного онкогена является ген *TP53*, мутации которого встречаются более чем в половине всех случаев онкологических заболеваний и приводят к потере функции *TP53* как опухолевого супрессора и наделяют раковые клетки более злокачественными свойствами. Для изучения влияния гиперэкспрессии онкогенных вариантов *TP53* мы разработали генетические конструкции с системой флуоресцентной индикации.

В качестве системы детекции хромосомной нестабильности мы применили клетки фибросаркомы человека HT1080 с интегрированной в них искусственной хромосомой НАС/dGFP. HT1080 — это клеточная линия фибросаркомы человека, которая широко используется в биомедицинских исследованиях. Внедренная в нее искусственная хромосома, экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок GFP, является маркером сегрегации хромосом. При возникновении ХН клетки теряют искусственную хромосому и флуоресцентный сигнал. По соотношению GFP-положительных и GFP-отрицательных клеток в популяции можно количественно определять эффект от факторов, вызывающих хромосомную нестабильность и детектировать время ее возникновения [4].

Мы предполагаем, что данная система позволит количественно сравнивать роли клинически значимых мутаций в процессе развития опухоли и оценивать их влияние на уровень ХН, что

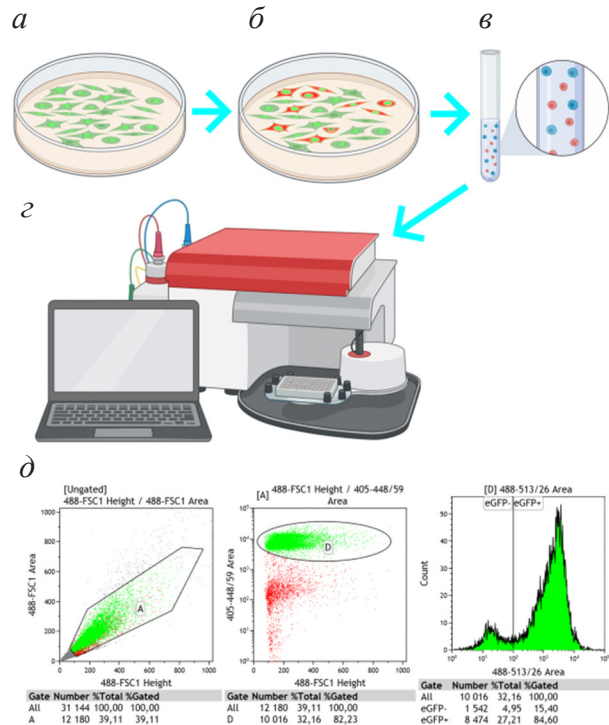


Рис. 1. Технологическая карта эксперимента.

а — трансфекция клеточной линии HT1080; б — инкубация клеток в течение 72h; в — фиксация и окраска клеток DAPI; г — проточная цитофлуоретрия; д — диаграмма рассеяния

\* Исследование финансировалось в рамках гранта РФФИ №21-75-00100.

может стать критерием внедрения новых значимых маркеров в качестве диагностических признаков и мишеней для таргетной терапии опухолей.

Результаты исследования (рис. 2) показывают, что различные полиморфизмы в ДНК-последовательности гена *TP53* по-разному влияют на уровень хромосомной нестабильности. Так, мутация R273H вызывает наибольшую потерю зеленого сигнала во всей клеточной популяции, а, следовательно, оказывает наибольшее влияние на уровень ХН среди исследуемых мутаций. Чуть меньше на уровень хромосомной нестабильности влияет вариант R175H. Уровень ХН при экспрессии варианта R273C статистически не отличим от контрольной клеточной популяции с экспрессией дикого типа *TP53*. Чем обусловлены данные различия, предстоит выяснить в последующих исследованиях.

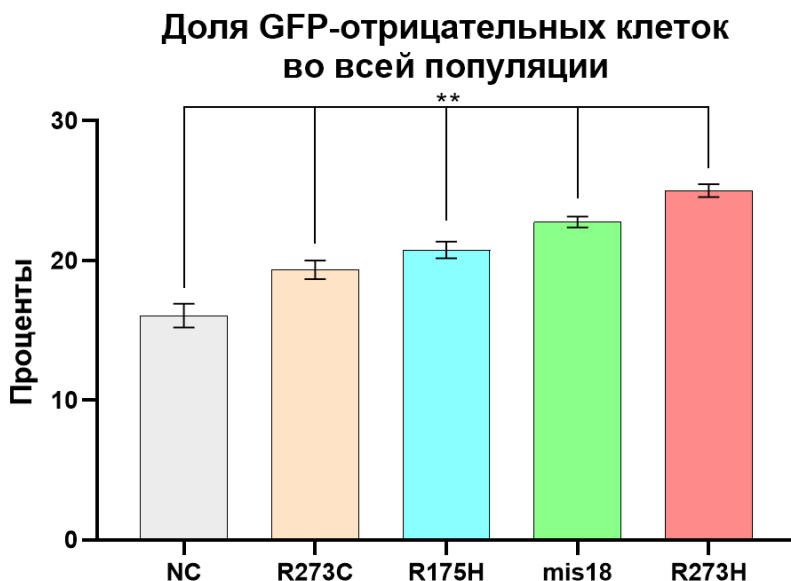


Рис. 2. Диаграмма, показывающая соотношение GFP-отрицательных клеток в разных популяциях HT1080

Таким образом, можно сделать вывод, что мутации гена *TP53* хоть и участвуют в появлении невосприимчивости к ХН у опухолевых клеток, но также некоторые мутантные варианты могут оказывать влияние и на появление ХН, что подтверждает некоторые исследования [5, 6, 7].

#### Литература

1. Dewhurst S.M. et al. Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution // *Cancer Discov.* 2014. Vol. 4, № 2. P. 175–185.
2. Thompson S.L., Compton D.A. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells // *J. Cell Biol.* 2008. Vol. 180, № 4. P. 665–672.
3. Gronroos E., López-García C. Tolerance of chromosomal instability in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities // *Cancer Res.* 2018. Vol. 78, № 23. P. 6529–6535.
4. Kim J.-H., Goncharov N.V. et al. Development of a novel HAC-based «gain of signal» quantitative assay for measuring chromosome instability (CIN) in cancer cells // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 12. P. 14841–14856.
5. Fojter F. et al. Chromosome instability induced by Mps1 and p53 mutation generates aggressive lymphomas exhibiting aneuploidy-induced stress. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014. Vol. 111, № 37. P. 13427–13432.
6. Grim J.E. et al. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer // *Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 32, № 11. P. 2160–2167.
7. Matano M. et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids // *Nat. Med.* 2015. Vol. 21, № 3. P. 256–262.

## ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ОЧАГОВ ЧУМЫ ПРИКАСПИЯ

А. Н. Балыкова, Г. А. Ерошенко

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

✉ alinabalnik@gmail.com

### Аннотация

Установлена популяционная структура высоковирулентного и эпидемически значимого средневекового биовара *Yersinia pestis* (линия 2.MED) в очагах Прикаспия в период 1912–2015 гг. По результатам масштабного SNP/MLVA25-генотипирования 153 штаммов создана база данных ключевых генотипов возбудителя чумы с территорий Прикаспийского региона, включающая 8 SNP- и 51 MLVA25-генотип.

Бактерия *Yersinia pestis* является возбудителем зоонозной природно-очаговой особо опасной инфекционной болезни — чумы, оставившей беспрецедентный след в истории и по-прежнему сохраняющей свой пандемический потенциал. Молекулярно-генетические исследования природных очагов чумы Восточной Европы и Центральной Азии показали, что из четырех вирулентных биоваров основного подвида *Y. pestis* преобладающее распространение получил средневековый биовар, который занимает 93,3 % территорий этих очагов с общей площадью 1 959 965 км<sup>2</sup> [1, 2]. До сих пор остается неизвестным происхождение и причины высоких адаптационных характеристик средневекового биовара, что, безусловно, определяет важность изучения его геномного портрета. В конце XIX — начале XX вв. в Прикаспийском регионе происходили массовые вспышки чумы, филогенетического положения этиологических агентов которых не было установлено. Благодаря работе специалистов противочумной системы с начала XX в. собрана уникальная коллекция штаммов *Y. pestis*, которая хронологически отражает историю очагов чумы этого региона. Ее изучение позволило нам установить, что в начале XX в. этиологическими агентами вспышек чумы в северной части Прикаспия были штаммы филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара *Y. pestis* [3]. Целью наших дальнейших исследований явилось проведение полногеномного SNP-анализа и MLVA-типирования этих штаммов, что позволит получить их расширенный молекулярный портрет и выявить основные генотипы, характерные для территорий очагов чумы Прикаспия.

ДНК штаммов *Y. pestis* выделяли с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Высокопроизводительное секвенирование проводили по технологии Ion Torrent в системе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Для обработки данных и сборки необработанных коротких прочтений генома *de novo* использовали Ion Torrent Suite software package 5.12, FastQC v0.11.9., Unicycler v0.4.9. Для филогенетической реконструкции и SNP/MLVA25-генотипирования применялся ряд биоинформационных программ (snippy 4.6., jModelTest, SeaView 5.0.4, PhyML 3.1, Bionumerics 7.6.3., Tandem RepeatsFinder 4.09, MEGA X, FigTree 1.4.3.).

Нами проведено комплексное исследование 153 штаммов *Y. pestis* из очагов Прикаспия. Штаммы выделены от носителей, переносчиков и от человека в период 1912–2015 гг. По биохимическим свойствам все изученные штаммы представлены типичным фенотипом средневекового биовара *Y. pestis*: Gly<sup>+</sup> Nit<sup>-</sup> Rha<sup>-</sup> Ara<sup>+</sup>. Согласно филогенетической реконструкции методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) на основе 2056 SNPs, идентифицированных в коровом геноме 57 штаммов *Y. pestis* из природных очагов Прикаспия и других очагов мира, выявлено наличие трех популяций средневекового биовара: этиологических агентов вспышек чумы 2.MED4, 2.MED1 первой половины XX в. и 2.MED1 второй половины XX — начала XXI вв. Выявлены причины активизации природных очагов чумы Прикаспия во второй половине XX в. после длительного межэпизоотического периода. Получены новые данные по мутационной изменчивости генов у средневекового биовара: *hemS* гемодеградирующего фактора, *cafIM* периплазматического шаперона белковой капсулы F1, *ssaJ* аппарата секреции III типа из семейства YscD / HrpQ. С помощью молекулярно-генетического анализа полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP) и вариабельных тандемных повторов в локусах VNTR (MLVA) среди штаммов с этих территорий определены 19 генов с SNPs, представляющие 8 SNP-генотипов, и 51 MLVA25-генотип. Создана база данных SNP/MLVA25-профилей территорий Прикаспия в программе Bionumerics 7.6.3 (Applied Maths). Полученные данные важны для получения целостной картины пространственно-временной циркуляции средневекового биовара в период эпидемической активности Прикаспийских очагов чумы и причин его дальнейшей экспансии на территориях Восточной Европы и Центральной Азии.

**Литература**

1. Попов, Н. В. и др. Эпидемиологическая ситуация по чуме в 2020 г. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации и других стран СНГ на 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. Вып.1. — С. 52-62. doi.10.21055/0370-1069-2021-1-52-62
2. Kutyrev, 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. — 9:1106. doi: 10.3389/fmicb.2018.01106
3. Eroshenko, G. A. et al. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th-21st centuries // PloS One. — 2021. — 16(2): e0244615. — <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244615>

**MLST-АНАЛИЗ ШТАММА QAZSL-4 SALMONELLA ENTERICA SUBSP. ENTERICA, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КУРИНОГО МЯСА**

С. М. Бармак

*Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Алматы, Казахстан*

✉ sabyr95@mail.ru

**Аннотация**

Был проведен MLST-анализ штамма QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* выделенного из образца куриного мяса в 2018 году с использованием программы MLST-2.0. Полученные результаты дополняют ресурсы штаммов *Salmonella*, что поможет в будущем при мониторинге и контроле микроорганизмов пищевого происхождения в Казахстане.

Возбудитель сальмонеллы относится к роду *Salmonella*, семейству кишечных бактерий *Enterobacteriaceae*, в настоящее время насчитывается более 2000 серотипов сальмонелл. В эпидемиологическом отношении наиболее значимы для человека лишь несколько сероваров, которые обуславливают развитие около 85–91 % сальмонеллёзов человека на всех континентах мира: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. panama*, *S. infantis*, *S. newport* и др.

*Salmonella enterica* является важным патогеном пищевого происхождения, вызывающим пищевые отравления и инфекции у людей и представляющим серьезную угрозу для безопасности пищевых продуктов и здоровья населения. Значительное место в эпидемиологии сальмонеллёза занимают птицы, особенно, водоплавающие, которые служат мощным резервуаром различных сальмонелл. Сальмонеллы обнаруживают не только в мясе и внутренних органах птиц, но и в яйцах. Инфицированные яйца по внешнему виду, запаху и вкусовым качествам не отличаются от нормальных.

Типирование сальмонелл необходимо для идентификации, отслеживания, эпидемиологического расследования и мониторинга бактерий. Мультилокусное типирование последовательностей (multilocus sequence typing (MLST)) является стандартным методом бактериального типирования с высоким разрешением, основанной на секвенировании всего генома для точного отслеживания бактерий. С появлением методов секвенирования следующего поколения (NGS) инструменты геномного типирования становятся все более популярными и эффективными.

Цель исследования — проведение MLST-анализа казахстанского штамма QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, выделенного из куриного мяса.

Полный геном штамма QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, выделенного из куриного мяса депонирован в Генбанк (BioSample: SAMN22222384).

Штамм QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* выделен из образца куриного мяса, которое было отобрано случайным образом на розничном рынке в 2018 году в рамках мониторинговых исследований пищевых продуктов по грантовому проекту AP05131147 МОН РК. Штамм выращивали и поддерживали на питательном агаре с добавлением 0,5 % NaCl при 37°C и хранили в 19 % обезжиренном молоке.

Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора PrepMan® Ultra-Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

Библиотеки для секвенирования ДНК готовили с помощью набора для подготовки библиотеки ДНК Nextera DNA Flex Library Prep. с окончательным выбором размера библиотеки 600 п.н. Секвенирование проводили с использованием Illumina MiSeq V3 300 п.н. для секвенирования парных концов. Геном был собран с помощью SPAdes v. 3.13.2. Анализ штамма QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* проводили с помощью программы MLST-2.0 (Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria).

Полная последовательность генома казахстанского штамма QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, имела консенсусную длину 4,711,816 п.н. охватывающий 49 контигов, со значением N50, равным 491,954 п.н., и значением L50, равным трем контигам. Состав GC пар — 52,1 %.

MLST-анализ штамма QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* проведен с использованием программы MLST-2.0, которая показала 100 % покрытие и идентичность со штаммами ST 11 *Salmonella enterica*. Длина выравнивания и длина аллелей 7 генов соответствовали: *aroC*-501, *dnaN*-501, *hemD*-432, *hisD*-501, *purE*-399, *sucA*-501, *thrA*-501. Таким образом, штамм QazSL-4 *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* относится к бактериям *Salmonella* ST 11 (ST11, alleles: *aroC*-5, *dnaN*-2, *hemD*-3, *hisD*-7, *PprE*-6, *sucA*-6, *thrA*-11)

Эти результаты значительно дополняют ресурсы штаммов *Salmonella*, генетическую информацию и данные прослеживаемости, облегчает типирование, идентификацию бактерии *Salmonella* и, следовательно, повышает уровень анализа, мониторинга и контроля микроорганизмов пищевого происхождения в Казахстане.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ\*

И. А. Бауэр, Е. В. Дмитриенко

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

✉ elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru

### Аннотация

Актуальной задачей современной молекулярной биологии и биомедицины является разработка эффективных систем доставки противоопухолевых препаратов на основе сывороточного альбумина человека (HSA). В работе были исследованы нековалентные взаимодействия HSA с доксорубицином, фолиевой кислотой и модельными олигонуклеотидами. Помимо нековалентного связывания, были апробированы подходы ковалентной модификации белка фолиевой кислотой и олигонуклеотидами.

В области лечения онкологических заболеваний существует острая потребность в разработке новых систем адресной доставки, которые дадут возможность преодолеть трудности, связанные с использованием традиционной химиотерапии. Перспективной основой для таких систем, характеризующихся повышенной специфичностью и контролируемым высвобождением, является HSA вследствие его нетоксичности, биосовместимости, биоразлагаемости и универсальной связывающей способности. Кроме того, альбумин способен накапливаться в опухоли либо за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания, либо посредством рецептор-опосредованного трансцитоза. Для повышения адресности конструкций на его основе возможно использование направляющих на опухоль лигандов, введение которых может быть осуществлено путем как нековалентного, так и ковалентного присоединения.

Цель данного исследования заключалась в комплексном изучении межмолекулярных взаимодействий HSA с противоопухолевым препаратом доксорубицином, направляющим агентом фолиевой кислотой, а также модельными олигонуклеотидами, в том числе модифицированными, которые обладают потенциалом как терапевтических, так и направляющих молекул. В ходе работы методами флуоресцентной спектроскопии, микроскопического термофореза, а также изотермической титрационной калориметрии были определены параметры нековалентного взаимодействия HSA с выбранными соединениями. Стоит отметить, что подход нековалентного связывания терапевтических препаратов с HSA оказывается предпочтительным, поскольку обеспечивает медленное высвобождение и улучшает биодоступность различных лекарственных средств без ущерба для их профиля безопасности. Однако величины констант нековалентного связывания HSA с нацеливающими лигандами может быть недостаточно, чтобы комплекс между носителем и направляющим агентом не подвергся разрушению в процессе доставки лекарственного средства в сайт опухоли. Поэтому, помимо нековалентного связывания, нами были апробированы подходы ковалентной модификации HSA фолиевой кислотой и модельными олигонуклеотидами путем использования сшивающих реагентов или фотоактивации. После чего были проведены исследования по определению влияния внесенных модификаций на нековалентное связывание доксорубицина с HSA. А также проведена оценка эффективности ингибирования роста опухолевых клеток противоопухолевым препаратом в комплексе с исследуемым белком и конъюгатами на его основе *in vitro*.

Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы при разработке и конструировании систем направленной доставки лекарственных средств с использованием сывороточного альбумина человека.

\* Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1.  
© И. А. Бауэр, Е. В. Дмитриенко, 2022

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ, ИНДУЦИРУЮЩИХ ТРАНС-СПЛАЙСИНГ  
В ЛОКУСЕ MOD(MDG4) У DROSOPHILA MELANOGASTER\***

О. П. Бегинязова<sup>1,2</sup>, Ю. В. Солдатова<sup>1</sup>, О. Г. Максименко<sup>1</sup>,  
П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, М. В. Тихонов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт

✉ oguljan.1994@mail.ru

**Аннотация**

Альтернативный сплайсинг находится под контролем РНК-связывающихся белков, специфическое привлечение которых в регулируемые гены является недостаточно изученным вопросом. В работе на примере локуса *mod(mdg4)* показано, что для индукции транс-сплайсинга необходимы ДНК элементы в промоторе и теле гена, а так же РНК-последовательности в интроне.

У эукариот в ходе транскрипции или после нее большинство пре-мРНК подвергаются сплайсингу, в процессе которого интроны вырезаются из пре-мРНК, а экзоны соединяются между собой. Часто на основе одной пре-мРНК в результате альтернативного сплайсинга образуются несколько вариантов мРНК. Альтернативный сплайсинг находится под контролем РНК-связывающихся белков, которые распознают определенные мотивы пре-мРНК и определяют, насколько эффективно соседние сайты сплайсинга будут участвовать в формировании изоформ мРНК. Как правило, мотивы РНК-связывающихся белков вырождены, поэтому должен существовать способ специфического привлечения факторов на гены, сплайсинг которых находится под их контролем.

У *Drosophila melanogaster* в локусах *lola* и *mod(mdg4)* обнаружен уникальный пример альтернативного сплайсинга. У этих локусов формирование мРНК осуществляется за счет транс-сплайсинга, при котором соединяются экзоны, расположенные на разных молекулах пре-мРНК. У *mod(mdg4)* транс-сплайсинг происходит между общим для всех изоформ донорным транскриптом и одним из 31-го варианта акцепторов. Альтернативные акцепторные экзоны собраны в несколько групп, у каждой из которых есть свой промотор.

Локус *mod(mdg4)* — яркий пример необходимости рекрутирования специфических факторов сплайсинга в гены. Обычно транс-сплайсинг не наблюдается в клетках как рядовой процесс, так как он может привести к формированию случайных химерных мРНК, кодирующих неправильные белки. Поэтому у *mod(mdg4)* есть дополнительная система регулирования, под контролем которой осуществляется транс-сплайсинг между надлежащими транскриптами. Поэтому поиск регуляторных элементов, за счет которых появляется возможность нарушить типичную программу созревания транскрипта, приблизит понимание механизма транс-сплайсинга у высших эукариот и расширит общее понимание процессов альтернативного сплайсинга и его регуляции.

Для поиска регуляторных последовательностей, необходимых для осуществления транс-сплайсинга локуса *mod(mdg4)*, была разработана модельная система, которая состоит из донорной и акцепторной конструкций, кодирующих соответствующие пре-мРНК. Эти конструкции по отдельности были интегрированы в 22A2 локус второй хромосомы *Drosophila melanogaster*. Анализ проводили на гетерозиготных линиях, одновременно несущих обе конструкции в одном локусе. Наличие событий транс-сплайсинга определяли с помощью ОТ-кПЦР и по активности люциферазы, трансляция которой возможна только с химерного транскрипта. Для выявления регуляторных элементов был получен ряд конструкций с различными модификациями в донорном транскрипте.

Ранее было показано, что последовательность из 117 п.н., расположенная в центральной части последнего интрона 4 донорного транскрипта, является критической для транс-сплайсинга. В настоящей работе показано, что этот регион содержит не менее четырех различных мотивов, которые могут поддерживать транс-сплайсинг. Удаление любого из них по отдельности не вызывает нарушений в транс-сплайсинге. Однако, изменения, затрагивающие одновременно несколько фрагментов, снижают его эффективность, что говорит об избыточности элементов для обеспечения надежности функционирования системы.

Было показано, что наличие только интрона 4 недостаточно для транс-сплайсинга. Поэтому были получены конструкции с заменой промотора и с изменениями в экзонах и интронах донорного транскрипта. Было показано, что наличие хотя бы одного элемента из трех (промотора, интрона 3 или экзона 4) достаточно для сохранения транс-сплайсинга.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что на промотор и тело гена *mod(mdg4)* за счет ДНК связывающихся белков привлекаются специфические факторы сплайсинга, включая РНК-связывающиеся белки, которые в интроне 4 реализуют программу транс-сплайсинга.

\* Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации [075-15-2019-1661].

## ВАРИАНТЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОЖИРЕНИЯ

А. А. Берсенева, Л. Н. Комарова, Е. Р. Выпова, П. С. Купцова

*Обнинский институт атомной энергетики —  
филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ*

✉ sashaart0611@gmail.com

### Аннотация

Проведен ПЦР-анализ в режиме реального времени для определения генотипа по генам FTO, PPARG, ADRB2, ADRB3, ответственных за генетическую предрасположенность к ожирению.

Распространенность ожирения и сопутствующих ему заболеваний в наше время достигла масштаба глобальной эпидемии. На сегодняшний день ожирение является одним из самых распространенных заболеваний экономически развитых стран, где четверть населения имеет массу тела, более чем на 15 % превышающую норму [1]. Однако ожирение не всегда связано с излишним потреблением продуктов питания. Следует учитывать генетическую предрасположенность к ожирению. Существует большое разнообразие генов-кандидатов, которые могут оказывать влияние на ожирение и избыточную массу тела. В настоящее время проводится множество исследований для определения генов предрасположенности к ожирению, анализируются взаимосвязи полиморфизмов генов с различными компонентами метаболического синдрома [2].

Для анализа на полиморфность генов ассоциированного с жировой массой было обследовано 95 студентов ИАТЭ НИЯУ МИФИ. Перед проведением анализа у всех обследуемых лиц провели антропометрические измерения — измеряли рост и вес, исходя из этих данных, для каждого рассчитывали индекс массы тела (ИМТ). По результатам обследования большая часть обследуемых лиц — это 72,3 % студентов имеют нормальную массу тела, избыточную массу тела имеет 15,6 % от всех обследуемых лиц, 14,1 % студентов имеют дефицит массы тела, ожирение 1 степени имеет 4,3 % от всех обследуемых лиц. Для уточнения значения ИМТ у всех обследуемых лиц определили тип распределения жира в организме человека. Из полученных результатов выявлено, что 87,5 % обследуемых лиц имеет гиноидный тип распределения жира в организме, что может свидетельствовать о нарушении липидного обмена в организме человека. 12,5 % студентов имеют промежуточный тип распределения жира в организме, что также может свидетельствовать о нарушении липидного обмена.

Для всех обследуемых лиц мы провели ПЦР-анализ в режиме реального времени для определения генотипа по генам FTO, PPARG, ADRB2, ADRB3, ответственных за генетическую предрасположенность к ожирению.

Для выделения ДНК из соскобов со слизистой оболочки щеки использовали коммерческий набор «S-Сорб» (Синтол). Диагностические наборы для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР «SNP-Скрин» в режиме реального времени были получены в фирме «Синтол». Система «SNP-Скрин» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека. Анализу подвергается геномная ДНК человека, выделенная из буккального эпителия.

По результатам ПЦР-анализа можно было определить: нормальный вариант полиморфизма генов (мутация отсутствует), мутация в гетерозиготной форме (в одном из парных генов), мутация в гомозиготной форме (в обоих парных генах). Результаты представлены в таблице.

**Распределение генетических вариантов**

	<b>FTO (rs9939609)</b>	<b>PPARG (rs1801282)</b>	<b>ADRB2 (rs1042713)</b>	<b>ADRB3 (rs4994)</b>
Гомозигота по аллели 1 (мутация отсутствует)	33 %	69 %	8 %	92 %
Гетерозигота	49 %	28 %	44 %	8 %
Гомозигота по аллели 2	18 %	3 %	48 %	0 %

Наличие мутации в данных генах говорит о том, что у данных людей есть генетическая предрасположенность к ожирению. Среди них 8 человек имеют дефицит массы, 37 человек имеют нормальную массу тела, 8 человек избыточную массу.

Результаты исследования свидетельствуют о перспективности выбранного направления. Так как раннее выявление генетической предрасположенности, в данном случае к ожирению, а так же и к другим видам



---

заболеваний, позволит своевременно принимать меры по недопущению развития патологических состояний и вовремя корректировать изменение состояния, что позволит вести здоровый образ жизни на протяжении многих лет.

#### **Литература**

1. Информационный бюллетень ВОЗ «Ожирение и избыточный вес». Апрель 2020.
2. Бородина С.В., и др. Генетические предикторы развития ожирения. // Ожирение и метаболизм. — 2016. -Т.13. — №2. — С.7-13.

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ФАКТОРА ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eRF1\*

Н. С. Бизяев<sup>1</sup>, А. В. Шувалов<sup>1,2</sup>, Т. В. Егорова<sup>1,2</sup>, И. Ю. Торопыгин<sup>3</sup>,  
Е. Ю. Шувалова<sup>1,2</sup>, К. С. Евменов<sup>1</sup>, Е. З. Алкалаева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Москва

<sup>2</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва

✉ bizyaev@eimb.ru

### Аннотация

Эукариотический фактор терминации трансляции 1 (eRF1) подвергается метилированию в GGQ-мотиве, необходимом для осуществления гидролиза пептидил-тРНК. Однако влияние этой модификации на функционирование eRF1 не исследовано. В рамках данной работы мы показали, что метилирование eRF1 человека стимулирует гидролиз пептидил-тРНК, а также повышает его специфичность путем предупреждения конкуренции с тРНК на других этапах трансляции.

Эукариотический фактор терминации 1 (eRF1) является ключевым фактором терминации трансляции. Он содержит аминокислотный GGQ-мотив, критически важный для осуществления реакции гидролиза пептидил-тРНК, имеющийся также у архейного гомолога aRF1 и бактериальных аналогов RF1 и RF2. Остаток глутамина данного мотива метилируется с помощью NEMK-подобных метилтрансфераз как у бактерий, так и у эукариот [1]. Показано, что метилирование бактериальных факторов терминации RF1 и RF2 повышает скорость гидролиза ими пептидил-тРНК [2]. Кроме того, у бактерий с нокаутом *NEMK* возрастает частота сквозного чтения стоп-кодона, а скорость их роста замедляется [3]. Однако, для эукариот влияние метилирования eRF1 на его функционирование пока не исследовано. Известно лишь, что при нокауте NEMK-подобной метилтрансферазы арабидопсиса происходит остановка рибосом в районе стоп-кодона, что может указывать на неэффективную терминацию трансляции в отсутствие метилирования eRF1 [4]. Также структурный анализ комплекса рибосомы и eRF1 показывает, что метилирование стабилизирует положение остатка глутамина в пептидилтрансферазном центре, что приводит к облегчению его атаки на молекулу воды [5]. Данная работа направлена на раскрытие функционального значения метилирования eRF1 у эукариот.

В результате коэкспрессии генов, кодирующих рекомбинантные eRF1 и NEMK-подобную метилтрансферазу, в клетках *Escherichia coli* нам удалось получить метилированные eRF1 или его точечные мутанты. Метод коэкспрессии оказался значительно проще и продуктивнее, чем использовавшиеся ранее методы *in vitro* метилирования. Наличие необходимой модификации было подтверждено масс-спектрометрией. Мы обнаружили, что метилирование всего белка более эффективно, чем метилирование коротких пептидов, а наличие GGQ-мотива критично для метилирования.

Для изучения функционального влияния метилирования мы использовали очищенные претерминационные комплексы, позволяющие изучать влияние различных факторов на терминацию трансляции *in vitro*. Мы обнаружили, что метилирование eRF1 человека стимулирует гидролиз пептидил-тРНК. При этом подавленная эффективность терминации трансляции мутантов по GGQ-мотиву и его ближайшему окружению не восстанавливается при метилировании. Мы также обнаружили, что избыточное количество неметилированного eRF1 ингибирует общий уровень трансляции, тогда как метилирование эффективно супрессирует такой эффект.

Полученные результаты позволяют заключить, что метилирование eRF1 у эукариот необходимо как для обеспечения высокого уровня терминации трансляции, так и для повышения специфичности распознавания стоп кодонов.

### Литература

1. Бизяев Н.С., Шувалов А.В., Алкалаева Е.З. NEMK-подобные метилтрансферазы в регуляции клеточных процессов // Молекулярная биология, 2022, том 56, №3, с. 439–450.
2. Pierson W.E. et al. Uniformity of Peptide Release Is Maintained by Methylation of Release Factors // Cell Rep., 2016. Vol. 17, № 1. P. 11–18.
3. Mora L. et al. Methylation of Bacterial Release Factors RF1 and RF2 Is Required for Normal Translation Termination in Vivo // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 49. P. 35638–35645.
4. Kailasam S. et al. A HemK class glutamine-methyltransferase is involved in the termination of translation and essential for iron homeostasis in Arabidopsis // New Phytol. 2020. Vol. 226, № 5. P. 1361–1374.
5. Li W. et al. Selective inhibition of human translation termination by a drug-like compound // Nat. Commun., 2020. Vol. 11, № 1. P. 4941.

\* Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-74-00279.

## ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ НА РАЗВИТИЕ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ У КРЫС \*

Ю. Г. Бирулина, О. В. Воронкова, Е. Е. Буйко, Н. А. Чернышов, М. М. Щербакова

*Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск*

✉ birulina20@yandex.ru

### Аннотация

Изучено влияние компонентов диет-индуцированного метаболического синдрома (МС) на развитие морфофункциональных изменений в бронхолегочной системе крыс. У крыс с МС были зарегистрированы признаки воспаления, повышение концентрации в крови TNF- $\alpha$ , IL-10, в лаважной жидкости — IL-6. Гистологическое исследование выявило деструкцию эпителия бронхов, развитие иммунного воспаления в бронхиальной стенке.

Хронические неинфекционные болезни органов дыхания представляют собой актуальную социально-медицинскую проблему вследствие высокой заболеваемости и частой инвалидизации пациентов [1]. Одним из факторов, способствующих развитию бронхолегочной патологии, является метаболический синдром (МС) [2, 3]. Увеличение распространенности МС в популяции определяет актуальность исследований, направленных на изучение его значимости в развитии бронхолегочной дисфункции. Целью исследования явилось изучение морфофункциональных изменений в бронхолегочной системе крыс при экспериментальном МС.

В качестве объекта исследования использовали крыс-самцов линии Wistar (33 животных), которых распределили на контрольную и опытную группу. Крыс контрольной группы содержали на стандартной диете. Крысы опытной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете, содержащей корм с добавлением животного жира (17 %), фруктозы (17 %), холестерина (0,25 %) с заменой питьевой воды на 20 % раствор фруктозы. Для контролирования развития МС у животных один раз в месяц измеряли АД и фиксировали вес. На 12 неделе исследования выполняли глюкозотолерантный тест. Животных выводили из эксперимента методом CO<sub>2</sub>-асфиксии, из сердца отбирали кровь, выполняли бронхоальвеолярный лаваж, извлекали висцеральную жировую ткань, комплекс сердце-легкие. В сыворотке крови оценивали биохимические параметры, включая показатели липидного спектра, а также концентрацию цитокинов IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  методом ИФА. В лаважной жидкости определяли концентрацию цитокинов IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  методом ИФА. Выполняли гистологическое исследование образцов бронхов крыс.

Содержание животных на высокожировой и высокоуглеводной диете приводило к ожирению, повышению артериального давления, гипергликемии, снижению толерантности к глюкозе, дислипидемии с выраженной триглицеридемией. Сывороточная концентрация IL-10 и TNF- $\alpha$  в крови у экспериментальных крыс оказалась выше, чем у здоровых животных в среднем в 3,7 и 4,2 раза, соответственно ( $p < 0,05$ ). При этом повышение уровня IL-6 в крови у животных опытной группы оказалось статистически недостоверным. В лаважной жидкости крыс опытной группы в среднем в 2 раза ( $p < 0,05$ ) увеличилась концентрация IL-6 по сравнению с контрольными значениями, но не IL-10 и TNF- $\alpha$ . При гистологическом исследовании бронхов крыс экспериментальной группы были обнаружены признаки десквамации эпителия, гипертрофии гладкомышечного слоя, гипертрофии перибронхиальной жировой ткани, выраженный отек, а также значительное увеличение площади бронхо-ассоциированной лимфоидной ткани. Выявленные органические изменения стенки бронхов могут лежать в основе функциональных нарушений сократимости гладких мышц воздухоносных путей и повышенной реактивности дыхательных путей.

### Литература

1. Будневский А.В., Овсянников Е.С., Лабжания Н.Б. Сочетание хронической обструктивной болезни легких и метаболического синдрома: патофизиологические и клинические особенности // Терапевтический архив. 2017. V. 89(1). P. 123–127.
2. Xie M., Liu X., Cao X., Guo M., Li X. Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017 // Respir. Res. 2020. V. 21(1). P. 49.
3. McCracken E., Monaghan M., Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome // Clin. Dermatol. 2018. Vol. 36 (1). P. 14–20.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20039, <https://rscf.ru/project/22-25-20039/> и средств Администрации Томской области.

**МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ\***

М. М. Бирюков<sup>1,2</sup>, Е. А. Патракова<sup>1,2</sup>, О. С. Троицкая<sup>1</sup>, Е. В. Милахина<sup>5</sup>,  
Д. Э. Закревский<sup>5</sup>, И. В. Швейгер<sup>4</sup>, Д. В. Семенов<sup>1</sup>, О. А. Коваль<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup>Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, Новосибирск

<sup>4</sup>Институт теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН, Новосибирск

✉ biryukov.mm@ya.ru

**Аннотация**

Проведен анализ транскриптома клеток линий А549 и Wi-38 после облучения холодной плазмой. Выявлены значительные отличия в характере ответа на индуцированный плазмой окислительный стресс между опухолевыми и здоровыми клетками как через 3, так и через 24 часа после облучения.

В последнее десятилетие активно разрабатываются подходы противораковой терапии с использованием холодной плазмы. В большом количестве исследований показаны цитотоксические и цитостатические эффекты холодной плазмы в отношении опухолевых клеток *in vitro*, а также торможение роста опухолей на экспериментальных животных *in vivo*. Несмотря на эти успехи, среди ученых до сих пор не существует консенсуса относительно молекулярного механизма наблюдаемых явлений.

Целью работы было выявление ключевых генов, вовлеченных в ответ на обработку клеток холодной плазмой.

В работе использовали устройство, разработанное в ИФП СО РАН совместно с ИТПМ СО РАН и генерирующее холодную плазменную струю (ХПС). Клеточные линии аденокарциномы легкого человека А549 и фибробласты легкого человека Wi-38 обрабатывали ХПС в условиях, обеспечивающих селективное цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки, как было описано ранее [1]. Через 3 и 24 часа после обработки выделяли суммарную РНК. Секвенирование проводили на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань).

В результате воздействия значительно изменялась ( $\log_{2}FC \geq 2$ ) экспрессия транскрипционных факторов, обеспечивающих ответ клетки на окислительный стресс и на повреждение ДНК. При этом характер изменения экспрессии отличался для клеток А549 и Wi-38. В образцах клеток через 3 часа после облучения холодной плазмой наблюдали увеличение экспрессии 82 генов для А549 и 84 генов для Wi-38, из них экспрессия 22 генов увеличилась в обеих линиях. Уменьшение экспрессии наблюдалось для 78 и 59 генов, соответственно, из них экспрессия 8 генов уменьшалась в обеих линиях. В случае опухолевых клеток наблюдалось увеличение экспрессии генов, вовлеченных в ответ на стресс, как через 3 часа, так и через 24 часа после облучения. В случае фибробластов легкого Wi-38 экспрессия этих генов увеличивалась через 3 часа в меньшей степени, через 24 часа возвращалась на исходный уровень. Полученные данные были верифицированы методом ОТ-ПЦР, была подтверждена динамика изменения экспрессии генов.

Таким образом, был проведен анализ транскриптомного профиля клеток после облучения ХПС. Показано, что ХПС индуцирует экспрессию генов, вовлеченных в ответ клеток на окислительный стресс и повреждение ДНК. Полученные результаты будут использованы в дальнейших исследованиях для оптимизации параметров воздействия холодной плазмой на живые организмы.

**Литература**

1. Холодная плазменная струя как новый противоопухолевый подход / М. М. Бирюков, Е. А. Патракова, О. А. Коваль [и др.] // VII международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов: в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020, Научоград Кольцово, 27–29 октября 2020 года. — Научоград Кольцово: Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 2020. — С. 204–206.

\* Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-19-00255-П.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗЫ Bst 3.0 ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОДГОТОВКИ К ПОЛНОГЕНОМНОМУ СЕКВЕНИРОВАНИЮ ВИРУССОДЕРЖАЩЕГО МАТЕРИАЛА

Н. Д. Болдырев, С. А. Боднев

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

✉ nik.boldyrev96@mail.ru

### Аннотация

Рассматривается применение полимеразы Bst 3.0 с ревертазной активностью для проведения пробоподготовки клинического материала методом SISPA. Предложенный нами метод позволяет получать ампликоны большой длины, что является преимуществом при дальнейшей подготовке библиотек на секвенирование.

Для секвенирования неизвестных вирусов в клинических образцах широко применяется метод пробоподготовки SISPA, подразумевающий неспецифическую полногеномную амплификацию с получением фрагментов ДНК, фланкированных с двух сторон известной последовательностью, входящей в состав случайных праймеров. В случае с РНК-содержащими вирусами требуется дополнительный этап обратной транскрипции для получения кДНК, используемой в дальнейшей амплификации. В настоящее время коммерчески доступна полусинтетическая полимеразы Bst 3.0 с ревертазной активностью и заявленной высокой процессивностью.

Цель настоящей работы — оценка возможности использования полимеразы Bst 3.0 для проведения подготовки к полногеномному секвенированию вирусосодержащего материала.

В качестве образцов использовались пробы, содержащие РНК SARS-CoV-2 и ДНК вируса осповакцины.

Был проведен отжиг геномов вирусов с праймерами FR20RV-6N, используемыми в методе SISPA, в стандартной и уменьшенной в два раза концентрации. Образцы были внесены в реакционные смеси, содержащие полимеразу Bst 3.0, динуклеотидтрифосфаты и соответствующий буферный раствор.

Амплификацию проводили при следующем температурном режиме: 18 °С — 3 минуты; 22 °С — 3 минуты; 45 °С — 3 минуты; 65 °С — 60 минут; 95 °С — 2 минуты; 4 °С — удержание температуры. Постепенное увеличение температуры позволило сохранить праймеры и растущую цепь в гибризованном с матрицей состоянии до достижения оптимальных для работы полимеразы температурных условий (65 °С) и получения длинных фрагментов. Благодаря ревертазной активности полимеразы Bst 3.0, этот этап приводит как к амплификации цепей ДНК вируса осповакцины, так и к получению кДНК на матрице РНК коронавируса. Для дальнейшей амплификации и получения второй цепи кДНК повторили программу амплификации с добавлением 1 мкл фермента.

В результате реакции были получены длинные фрагменты ДНК, фланкированные с двух сторон известными последовательностями из 20 нуклеотидов. Дальнейшую амплификацию проводили с праймерами FR20RV, комплементарными этим фланкирующим последовательностям и высокоточной высокопроцессивной полимеразой Q5 по инструкции производителя. Температурные профили различались длительностью отжига и элонгации — в одном случае отжиг 63 °С 30 сек, элонгация 72 °С 5 мин, в другом — отжиг 63 °С 5 мин, элонгация 72 °С 30 сек.

Электрофорез в агарозном геле показал наличие крупных фрагментов ДНК. В образцах, прошедших элонгацию в течение 5 минут, концентрации фрагментов больше 10000 пар оснований были выше.

Ампликоны очистили на магнитных частицах AmPure XP. Концентрации измерили на флуориметре Qubit IV. При более низкой концентрации праймеров (0,5 мкМ) и при элонгации 5 минут, концентрации ампликонов были на 30 % ниже, но их длина — больше, чем при более высокой концентрации праймеров (1 мкМ).

Таким образом, использование полимеразы Bst 3.0, обладающей ревертазной активностью, позволяет проводить подготовку к полногеномному секвенированию вирусосодержащего материала методом SISPA, независимо от типа нуклеиновой кислоты вируса. Активность замещения цепи данной полимеразы позволяет получать длинные ампликоны при сниженной концентрации праймеров. Дальнейшая амплификация данных фрагментов Q5-полимеразой при достаточном времени элонгации позволяет увеличить концентрации ампликонов без потери длины, что является преимуществом для дальнейшей подготовки библиотек на секвенирование.

## РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ IL 8 В РЕАЛИЗАЦИИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ\*

Т. В. Брус<sup>1</sup>, С. С. Пюрвеев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

✉ bant.90@mail.ru

### Аннотация

В настоящее время неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП) является одним из лидирующих заболеваний печени на планете. В России наиболее масштабные исследования показали прогрессивный рост распространенности НЖБП — 27 % в 2007 г., 37,1 % в 2014 г., в результате чего НЖБП заняла первое место среди прочих заболеваний печени.

Тесные корреляционные связи между НЖБП, абдоминальным ожирением и резистентностью к инсулину чрезвычайно затрудняют определение точных причинно-следственных взаимодействий, лежащих в основе повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с НЖБП.

Печень является одновременно мишенью и провокатором системного воспалительного ответа, а также источником проатерогенных молекул, которые усиливают повреждение эндотелия сосудов. Из адипоцитов высвобождает широкий спектр молекул, потенциально вовлеченных в развитие резистентности к инсулину и атеросклероза, включая свободные жирные кислоты, ИЛ 6, ФНО- $\alpha$  и другие провоспалительные цитокины.

На основании вышеизложенного основными посылами для настоящего исследования системной воспалительной реакции при жировой дистрофии печени неалкогольной этиологии являются непрерывность и единство патологических процессов, а также вероятность обратимости фиброза.

НЖБП является одной из наиболее приоритетных и социально-значимых проблем как педиатрии, так и терапии. Это обусловлено в первую очередь высокой распространенностью и прогрессирующим течением данного заболевания. Ранние осложнения проявляются симптомокомплексом, в который входят задержка темпов физического и полового развития и хроническое нарушение функции печени с формированием жировой дистрофии.

Потенциальные патофизиологические механизмы развития НЖБП включают следующие процессы: накопление в клетке свободных жирных кислот; дисбаланс адипокинов; активация клеток Купфера.

Все перечисленные механизмы приводят к манифестации и генерализации системного воспалительного ответа, что делает НЖБП провокатором множества сосудистых осложнений, в том числе инфарктов и инсультов. По этой причине в настоящее время раннее выявление маркеров системного воспалительного ответа при НЖБП является чрезвычайно важным.

Цель исследования — выявить ранние маркеры системного воспалительного ответа у лабораторных крыс при моделировании неалкогольной жировой болезни печени.

### Материалы и методы

Исследование проводилось на 40 крысах-самцах линии Wistar. Было сформировано 2 экспериментальных группы: 1. «Контроль» (n = 20) — здоровые, интактные крысы, у которых производилось исследование параметров метаболизма для расчета фоновых, референсных значений («нормальные показатели»); 2. «НАЖБП» (n = 20) — крысы, у которых воспроизводилась фруктозоиндуцированная модель НЖБП.

Для выявления маркеров системного воспалительного ответа с помощью иммуноферментного анализа определяли уровень интерлейкина 1 (IL 1), интерлейкина 2 (IL 2), фактора некроза опухоли (TNF). С помощью иммуногистохимического метода выявили рецепторы интерлейкина 8 (IL 8).

Результаты. В группе с НАЖБП был выявлен достоверно высокий уровень IL 1 (11,1 $\pm$ 1,7 пг / мл), IL 2 (30 $\pm$ 2,25 пг / мл), IL 6 (12,1 $\pm$ 0,56 пг / мл) по сравнению с контролем. Также в экспериментальной группе регистрировалась выраженная экспрессия IL 8. Это демонстрирует, что гепатоциты животных данной экспериментальной группы способны экспрессировать хемотаксический фактор нейтрофилов IL-8 в ответ на повышение медиаторов воспаления IL-1, IL-2 и TNF, что принципиально в цепи межклеточной связи цитокинов в печени при воспалительных процессах, опосредованных нейтрофилами при НЖБП.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта ректора ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава РФ 2022 года.  
© Т. В. Брус, С. С. Пюрвеев, 2022

**Выводы**

В настоящее время не существует общепринятых взглядов относительно механизма формирования НАЖБП, и это значительно затрудняет разработку алгоритмов его диагностики, эффективных мер профилактики и терапии. Важную роль в патогенезе НАЖБП играет активизация системного воспалительного ответа. Определение уровня основных провоспалительных маркеров показано для выяснения степени тяжести развития НАЖБП, ранней профилактики и коррекции осложнений.

**ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ\***А. Е. Булгакова<sup>1</sup>, Е. В. Дмитриенко<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*<sup>2</sup>*Новосибирский государственный университет*

✉ elenad@niboch.nsc.ru

**Аннотация**

В рамках работы исследовано влияние химических модификаций нуклеиновых кислот на эффективность систем диагностики. Показано, что введение модификаций в состав специфических праймеров для ПЦР повышает чувствительность и специфичность анализа; а использование незаряженных производных в качестве специфических зондов для биосенсоров на основе полевых транзисторов позволяет выявлять исследуемые аналиты без амплификации.

Нуклеиновые кислоты, их производные и аналоги служат молекулярными инструментами для решения практических задач биотехнологии, биомедицины и молекулярной диагностики. Введение химических модификаций в состав олигонуклеотидов позволяет направленно изменять их структуру, свойства, взаимодействие с биологически активными соединениями. Синтетические аналоги нуклеиновых кислот зачастую обладают улучшенными биологическими и физико-химическими свойствами.

В ИХБФМ СО РАН в 2014 г. были разработаны новые незаряженные фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов (ФГО) [1]. В настоящее время непрерывно ведутся исследования их физико-химических и биологических свойств, а также возможность их применения для решения широкого спектра фундаментальных и практических задач. За последние несколько лет в научной литературе не было приведено новых данных о синтезе производных нуклеиновых кислот с введением модификаций по рибозо-фосфатному остову сравнимых по свойствам с ФГО.

Конструирование и усовершенствование систем молекулярной диагностики является частью направления «персонализированная медицина», которое входит в число важнейших приоритетов научно-технологического развития Российской Федерации. Внедрение подобных технологий позволит добиться принципиально более высокого клинического, экономического и социального эффекта системы национального здравоохранения.

Наиболее широкое применение в клинической практике получили методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Структура праймеров для ПЦР в значительной степени определяет эффективность протекания реакции. Исследовано влияние положения, количества и взаимного расположения ФГ-модификаций на фермент-субстратные свойства олигонуклеотидов по отношению к ферменту Taq-полимеразе. Включение ФГ-модификаций в праймеры приводит к повышению специфичности анализа, что делает их передовыми инструментами для методов ПЦР. Кроме того, ФГ-модификация может служить универсальным дополнительным нарушением, подобным несоответствию, приводящим к повышению специфичности праймеров.

Новой альтернативой ПЦР-анализа могут стать высокочувствительные биосенсоры. В данной работе в качестве такого диагностикума был предложен безметочный кремний на изоляторе (КНИ) биосенсор на основе одномерной кремниевой микропроволоки. Принцип работы биосенсора заключается в адсорбции заряженных молекул на поверхность микропроволоки, которые индуцируют возникновение компенсирующих зарядов в микроразмерной структуре. В результате возникает ток, который течет между двумя электродами, фланкирующими микропроволоки. Таким образом, при связывании маркера на поверхности сенсорного элемента происходит изменение его поверхностного потенциала и, как следствие, увеличение силы тока, проходящего через сенсорный элемент.

Полностью модифицированные незаряженные фосфорилгуанидиновые олигомеры связываются с комплементарными последовательностями даже в деионизованной воде. Использование таких модифицированных олигонуклеотидов в качестве специфичных зондов позволит повысить селективность и чувствительность анализа на биосенсорах. В рамках данной работы была показана возможность образования специфичного гибридного комплекса на поверхности КНИ-биосенсора. Продемонстрирована высокая чувствительность разработанного метода анализа, которая достигает аттомольного уровня, что соответствует ~20 молекулам аналита в образце. Таким образом, КНИ-биосенсор является перспективным кандидатом в экспресс-диагностике.

**Литература**

1. Купрюшкин М. С., Пышный Д. В., Стеценко Д. А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот // Acta Naturae (русскоязычная версия). — 2014. — Т. 6. — №. 4 (23). — С. 123-125.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 22-24-00996.



## СОЧЕТАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАЗНЫХ ТИПОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА

А. А. Буракова, В. Н. Кипень, О. И. Добыш

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск*

✉ arina.burakova@mail.ru

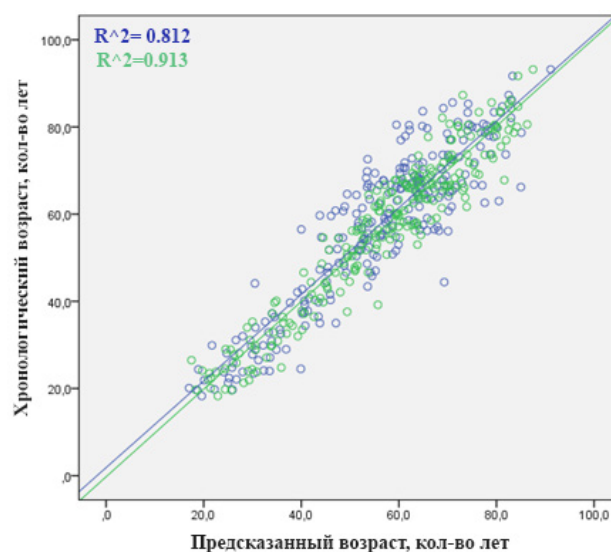
### Аннотация

Точность предсказания возраста человека при использовании эпигенетических маркеров для буккального эпителия и крови составила  $6,09 \pm 4,90$  года и  $4,24 \pm 3,04$  года, соответственно. При применении объединенных данных точность предсказания составила  $5,16 \pm 2,69$  года, что значительно улучшило результат, если возраст определялся лишь только по метилированию ДНК буккального эпителия.

В последние годы определение предполагаемого возраста человека по уровню метилирования ДНК является актуальной задачей, решение которой необходимо криминалистам при идентификации личности. Чаще всего на месте преступления находят пятна крови и слюны (буккального эпителия) или их комбинации. В таких случаях определение возраста по уровню метилирования ДНК проводится отдельно для каждого биологического образца [1, 2, 4]. Масштабное сравнение данных по метилированию разных типов биологических тканей для определения возраста индивида важно для установления тканевой специфичности степени метилирования ДНК человека. Цель данной работы — сравнить точность определения возраста человека при совмещении данных по метилированию CpG-сайтов для крови и буккального эпителия.

Материалом для исследования служили 235 образцов цельной крови и буккального эпителия (149 женщин и 86 мужчин) возрастом от 18 до 93 лет, взятых от людей, проживающих на территории Беларуси. Для цельной крови анализировали степень метилирования 12-ти CpG-сайтов, для буккального эпителия — 6-ти CpG-сайтов (2 общих с кровью — cg07547549 (*SLC12A5*) и cg14361627 (*KLF14*)) [3]. Уровень метилирования определяли с использованием технологии SNaPshot. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS v20.0.

При сравнительном анализе полученных данных выявлено, что для индивидов предсказанный возраст, определенный по отобраным эпигенетическим маркерам в образцах буккального эпителия, отличался от хронологического возраста в среднем на  $6,09 \pm 4,90$  года, скорректированный процент объяснённой дисперсии для буккального эпителия составил 81,2 %. Для образцов крови значение хронологического возраста от предсказанного отличается на  $4,24 \pm 3,04$  года, скорректированный процент объяснённой дисперсии для крови составил 91,3 % (см. рисунок).



Точность предсказания возраста по образцам буккального эпителия (синий цвет) и крови (зелёный цвет)

Разница между рассчитанными значениями эпигенетического возраста для крови и буккального эпителия составила  $6,90 \pm 5,21$  года. Статистической разницы между мужчинами и женщинами в представленной выборке не было обнаружено при определении предсказанного возраста. При использовании среднего значения между разницей предполагаемого и действительного возраста для крови и буккального эпителия точность предсказания составила  $5,16 \pm 2,69$  года.

Было показано, что точность предсказания возраста с помощью CpG-маркеров для буккального эпителия и крови составила  $6,09 \pm 4,90$  года и  $4,24 \pm 3,04$  года соответственно. При использовании объединенных данных для крови и буккального эпителия точность предсказания составила  $5,16 \pm 2,69$  года, что является лучшим результатом, если возраст определялся лишь только по метилированию ДНК буккального эпителия. При этом значение стандартного отклонения уменьшается, т. е. разброс значений становится меньше, что в целом положительно сказывается на точности определения возраста.

Таким образом, совместное использование данных по метилированию ДНК различных типов биологических тканей от одного индивидуума может улучшить точность предсказания возраста.

### Литература

1. DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples / S.-E. Jung [et al.] // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2019. Vol. 38 P. 1–8.
2. Development of the VISAGE enhanced tool and statistical models for epigenetic age estimation in blood, buccal cells and bones / VISAGE Consortium [et al.] // *Aging.* 2021. Vol. 13, № 5. P. 6459–6484.
3. Определение хронологического возраста человека по биологическим образцам на основании анализа метилирования CpG-динуклеотидов / В. А. Лемеш [и др.] // *Генетика.* 2021. Т. 57, № 12. С. 1376–1385.
4. A collaborative exercise on DNA methylation-based age prediction and body fluid typing / J. E. Lee [et al.] // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2022. Vol. 57 P. 102656.

## ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ТРАНСКРИПТОВ ЛОКУСА Q12.1, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАКОМ МОЗГА \*

О. Ю. Буренина<sup>1</sup>, Ю. П. Рубцов<sup>2</sup>, М. С. Павлюков<sup>2</sup>, О. Е. Мусатова<sup>2</sup>,  
Т. С. Зацепин<sup>3</sup>, М. П. Рубцова<sup>3</sup>, О. А. Донцова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва

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

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академ. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ o.burenina@skoltech.ru

### Аннотация

Впервые охарактеризованы транскрипты, соответствующие двум ранее неизученным некодирующим РНК (нкРНК), специфичным для тканей мозга. Экспериментально установлен факт неверной аннотации этих нкРНК в базах данных и определены наиболее активно экспрессирующиеся изоформы. Показано, что максимальный уровень экспрессии этих нкРНК наблюдается в первичных линиях глиобластомы, но не в иммортализованных клетках рака мозга человека.

Некодирующие РНК (нкРНК) — обширный класс регуляторных молекул, выполняющих различные функции в клетке. Активация уровня экспрессии многих нкРНК ассоциирована с канцерогенезом, что может быть использовано для онкодиагностики, особенно в случае нкРНК, специфичных для определенных типов рака. Ранее в нашей научной группе мы охарактеризовали новую печень-специфичную нкРНК HELIS [1]. Особый интерес вызвало её геномное окружение: в данном участке локуса q12.1 закодирован целый ряд ранее не описанных в литературе нкРНК, большинство из которых экспрессируются только в тканях мозга. В ходе биоинформатического анализа мы выбрали четыре кандидата РНК, для которых предполагалась активация экспрессии при глиобластоме. На первом этапе работы мы попытались детектировать данные нкРНК методом ОТ-кПЦР, используя панель из 12 неиммортализованных первичных линий глиом человека [2]. Только для LINC1102 и CABR1 были получены специфические ДНК-фрагменты, соответствующие суммарным транскриптам каждой из РНК. В качестве модельных объектов исследования мы также использовали четыре иммортализованные линии глиобластомы (U-87-MG и U-251-MG) и нейробластомы (IMR-32 и Sk-N-MC), однако экспрессия LINC1102 в них была на порядки ниже, а в случае CABR1 достоверно детектировать экспрессию удалось только для IMR-32 и Sk-N-MC. Такая тенденция была ожидаема, поскольку данные линии являются в большей степени эпителиальными и не обладают многими свойствами, характерными для опухолей головного мозга. Следующим этапом работы было определение конкретным транскриптов нкРНК. Для этих целей была выбрана линия глиомы с максимальной экспрессией обеих нкРНК. С помощью ОТ-кПЦР с парами праймеров, комплементарными различным экзонам (или местам их соединений), мы проверили экспрессию каждого отдельного фрагмента CABR1 и установили, что преобладающая изоформа не совпадает ни с одним из аннотированных транскриптов ввиду отсутствия двух основных экзонов и, наоборот, наличия одного минорного экзона. В случае LINC1102 задача сильно осложнялась, поскольку в базах данных содержалась противоречивая информация об аннотации до 35 различных изоформ в сумме содержащих до 40 альтернативных экзонов. Тем не менее, путем последовательного скрининга и идентификации продуктов амплификации при использовании различных пар праймеров для ПЦР, нам удалось исключить из рассмотрения большую часть минорных экзонов и составить примерные схемы транскриптов LINC1102. Далее на основе полученных данных для предполагаемых изоформ CABR1 и LINC1102 мы провели идентификацию их 5'- и 3'- концов методом RACE (rapid amplification of cDNA ends) с последующим секвенированием полученных фрагментов. В результате проделанной работы удалось определить два основных транскрипта LINC1102, каждый из которых имеет альтернативную минорную форму с пропуском одного из экзонов. Кроме того, мы обнаружили наличие нового, ранее не аннотированного экзона CABR1, длиной всего 41 н.о., расположенного в центре интрона длиной 3900 н.о. Хотя данный экзон содержится только в минорной изоформе CABR1 (которую экспрессируют в малом количестве только несколько первичных линий глиом и не экспрессируют иммортализованные клетки), полученные данные наглядно иллюстрируют вариативность сплайсинга нкРНК. Таким образом, тщательный анализ конкретных транскриптов крайне необходим, особенно для последующего использования нкРНК в качестве потенциальных онкомаркеров.

\* Работа поддержана грантом РФФИ № 21-34-70042 мол\_а\_мос.

**Литература**

1. Burenina O.Y. et al. Panel of potential lncRNA biomarkers can distinguish various types of liver malignant and benign tumors. // J Cancer Res Clin Oncol. 2021. V. 147. P. 49-59.

2. Kovalenko T.F. et al. Functions of long non-coding RNA ROR in patient-derived glioblastoma cells. // Biochimie. 2022. Vol. 200. P. 131-139.

## ДИСБАЛАНС ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ И ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМ ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС OXYS\*

А. О. Бурняшева, Е. А. Рудницкая, Д. В. Телегина

*Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

✉ burn.alena2505@mail.ru

### Аннотация

Болезнь Альцгеймера (БА) — неизлечимое, прогрессирующее с возрастом нейродегенеративное заболевание. Для его исследования необходимы адекватные биологические модели, одной из которых является линия преждевременно стареющих крыс OXYS. Развитие признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне изменения баланса возбуждающей глутаматергической и тормозной ГАМКергической систем со сдвигом в сторону повышенного образования ГАМК.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространённым прогрессирующим с возрастом нейродегенеративным заболеванием, которое характеризуется усиленным накоплением  $\beta$ -амилоида и образованием амилоидных бляшек в головном мозге, гиперфосфорилированием тау-белка и образованием нейрофибрилярных клубков, дисфункцией митохондрий, синаптической недостаточностью, гибелью нейронов, нарушением поведения и снижением способности к обучению и памяти. Показано, что нарушение баланса возбуждающей глутаматергической и тормозной ГАМКергической систем сопровождается развитием БА, однако, вклад этих изменений в развитие наиболее распространённой (более 95 % случаев) спорадической формы БА изучен недостаточно. Целью данного исследования является изучение изменений глутамат- и ГАМКергической систем в гиппокампе преждевременно стареющих крыс OXYS — уникальной модели БА, у которой развиваются все ключевые признаки заболевания.

В работе были использованы животные в возрасте 45 дней (период, предшествующий началу появления признаков БА), 3 месяцев (начало манифестации признаков БА), 12 месяцев (усиленное накопление  $\beta$ -амилоида в головном мозге) и 18 месяцев (прогрессия признаков БА). В качестве контроля использовали одновозрастных крыс линии Вистар. Мы проанализировали содержание ключевых ферментов, регулирующих цикл глутамат-ГАМК — глутаминазы (GA), катализирующей образование глутамата из глутамината; глутаминсинтетазы (GS) катализирующей образование глутамината из глутамата; глутаматдекарбоксилазы (GAD67) — преобразование глутамата в ГАМК и ГАМК-трансаминазы (GABA-T), разрушающей ГАМК с помощью вестерн-блот анализа. Кроме того, мы оценивали содержание рецепторов глутамата и ГАМК: NMDA-рецептора 1 (NMDAR1) и рецептора 2B субъединицы (NMDAR2B), AMPA-рецептора 1 субъединицы (AMPA1), GABA-A-рецептора  $\alpha 1$  субъединицы (GABAAR1) и транспортеров глутамата GLAST(EAAT1) и GLT-1(EAAT2).

Анализ показал, что уровни ферментов синтеза и распада глутамата GA и GS не изменялись с возрастом и между линиями у крыс Вистар и OXYS. Исследование уровня ферментов синтеза ГАМК показало, что уровень GABA-T был достоверно ниже, а GAD67 — выше в гиппокампе крыс OXYS (по сравнению с крысами Вистар) во всех исследуемых возрастах. Эти данные указывают на то, что развитие признаков БА в гиппокампе крыс OXYS сопровождается повышенным уровнем ГАМК. Кроме того, исследование уровня белка рецептора ГАМК GABAAR1 показало его повышенное содержание в гиппокампе крыс OXYS в период манифестации признаков БА (3 месяцев) по сравнению с крысами Вистар.

Важным фактором, определяющим доступность глутамата для сигнальных процессов, является система его обратного захвата и рециркуляции. Транспортёры глутамата GLAST и GLT1 удаляют глутамат из внеклеточного пространства и необходимы для поддержания низких, нетоксичных концентраций этого нейромедиатора. Исследование показало, что содержание белка GLAST возрастало к возрасту 12 месяцев, а затем снижалось к 18 месяцам в гиппокампе крыс OXYS и Вистар. Достоверных межлинейных различий не обнаружено. Содержание GLT1 значимо не изменялось с возрастом у крыс Вистар, но возрастало с возраста 3 до 12 месяцев у крыс OXYS, что может указывать на изменение обратного захвата глутамата.

Исследование содержания субъединиц NMDA рецептора показало, что уровень NMDAR1 субъединицы снижался с возрастом в гиппокампе крыс линии Вистар и не изменялся у крыс OXYS. Таким образом, уровень NMDAR1 был достоверно выше у крыс OXYS в возрасте 18 месяцев. Уровень белка субъединицы NMDAR2B не изменялся с возрастом и между линиями в гиппокампе крыс. В содержании AMPAR1 достоверных межлинейных и возрастных изменений не было обнаружено.

Таким образом, развитие признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне сдвига баланса глутамата и ГАМК в сторону более высоких уровней образования ГАМК, а также изменений в глутаматергической и ГАМКергической сигнальных системах.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта Российского Научного Фонда №21-75-00029.

## РОЛЬ АСТN4 В ПОДВИЖНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Г. В. Васильева, К. С. Новицкая, Е. В. Ломерт, Д. В. Кригер, Д. Г. Тентлер

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

✉ vip.giomar@mail.ru

### Аннотация

Исследование направлено на изучение механизмов участия альфа-актина 4 (АСТN4) в подвижности раковых клеток. АСТN4 — актин-связывающий белок, участвующий в различных клеточных процессах, включая характерные для опухолей. Экспрессия гена АСТN4 повышена в инвазивных участках некоторых солидных опухолей, при этом подавление АСТN4 приводит к ослаблению миграционных способностей раковых клеток. В ряде работ было показано, что АСТN4 влияет на активность транскрипционного фактора NF-κB. Наши данные указывают на то, что эффект АСТN4 на миграционную активность раковых клеток может быть частично обусловлен результатом его влияния на NF-κB-зависимую транскрипцию генов.

Цель работы — исследование роли АСТN4 в подвижности клеток немелкоклеточного рака легкого. Основным подходом в работе является получение линий с CRISPR/Cas9 нокаутом (КО) и с оверэкспрессией (ОЕ) гена АСТN4. В качестве объекта были выбраны линии клеток с эпителиальным (H460) и более подвижным, мезенхимным (H1299) фенотипом. Оценка подвижности линий, полученных в результате нокаута и сверхэкспрессии АСТN4, проводилась с помощью тестов на «заращение раны», а также с помощью системы анализа миграции клеток в реальном времени xCELLigence. Кроме того, мы изучили траекторию движения клеток в реальном времени с помощью конфокальной системы CQ1 (Yokogawa). Описание морфологии проводилось на основе метода иммуцитохимического окрашивания клеток.

Наши предварительные данные показывают, что замедление движения раковых клеток при нокауте гена АСТN4 происходит в результате нарушения способности клеток двигаться направленно. Это не связано с запуском эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП), так как экспрессия маркеров ЭМП в клетках с нокаутом АСТN4 не нарушена. В то же время сниженная экспрессия ICAM в клонах с нокаутом говорит о том, что АСТN4 может оказывать влияние на клеточные процессы, в том числе на движение клеток, через подавление NF-κB сигналинга.

Для выяснения, происходит ли подавление NF-κB пути на уровне передачи сигнала в цитоплазме клетки или на уровне работы транскрипционного фактора RelA в ядре, мы запустили индукцию NF-κB пути с помощью TNFα, а также получили линии с экзогенной экспрессией гена RelA. Также на следующем этапе мы планируем сделать ChIP, чтобы понять, взаимодействует ли АСТN4 с RelA на промотере гена ICAM. Таким образом, изменение экспрессии АСТN4 может влиять на подвижность раковых клеток за счёт изменения клеточного сигналинга через NF-κB путь.

БЕЛОК PCID2 ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С мРНК НАПРЯМУЮ *IN VITRO* \*Ю. А. Вдовина<sup>1,2</sup>, Д. В. Копытова<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

✉ yuvdov2020@gmail.com

**Аннотация**

Белок PCID2 выступает в роли фактора экспорта мРНК из ядра в цитоплазму у эукариот, а также обладает функциями в процессе транспорта локализуемой мРНК в цитоплазме. Механизмы и участники этих процессов по-прежнему мало изучены. В данной работе показано, что PCID2 *D. melanogaster* напрямую специфично взаимодействует с мРНК *in vitro*, а также определены участки белка, вовлеченные в это взаимодействие.

Белок PCID2 является субъединицей комплекса TREX-2, отвечающего за общий ядерный экспорт мРНК у эукариот. В результате нокаута субъединиц комплекса происходит задержание и накопление мРНК в ядре. PCID2 также присутствует в цитоплазме клетки, где принимает участие в цитоплазматическом транспорте мРНК у *D. melanogaster* [1]. В настоящее время молекулярная основа процесса экспорта и дальнейшего транспорта мРНК в цитоплазме остается малоизученной.

На модели дрожжей ранее было показано, что гомологичные субъединицы PCID2 и Xmas-2 образуют внутри комплекса TREX-2 общую поверхность для взаимодействия с мРНК [2]. Проверка наличия прямого взаимодействия PCID2 *D. melanogaster* с мРНК была проведена в исследовании взаимодействия PCID2 с [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-мечеными фрагментами мРНК гена *ras64B* методом EMSA. Было показано, что PCID2 специфично связывает фрагмент из 3'-нетранслируемой области мРНК независимо от белка Xmas-2.

У гомолога PCID2 дрожжей на С-конце белка были определены консервативные аминокислоты, отвечающие за взаимодействие с мРНК [2]. Для подтверждения взаимодействия этого участка PCID2 *D. melanogaster* с мРНК был получен вариант белка PCID2 с делецией в С-концевом домене. Этот белок показал более слабое взаимодействие с мРНК, что доказало участие С-концевого домена в связывании мРНК, но одновременно выявило существование другого сайта связывания в белке. С целью обнаружения всех доменов взаимодействия с мРНК были получены белки, содержащие N, M и C последовательности белка PCID2. В экспериментах EMSA было установлено, что во взаимодействии с мРНК *ras64B* вовлечены два домена белка — M и C. При этом С-домен показывал специфичное взаимодействие, тогда как M-домен — неспецифичное.

Выравнивание последовательностей M-домена ортологов PCID2 позволило определить несколько аминокислотных остатков, потенциально отвечающих за связывание с РНК. Путем сайт-направленного мутагенеза в M-домен полноразмерного PCID2 были внесены соответствующие точечные замены. Внесение этих мутаций привело к исчезновению связывания РНК белком PCID2.

Таким образом, было показано, что белок PCID2 *D. melanogaster* напрямую специфично взаимодействует с мРНК; в этом взаимодействии участвуют несколько сайтов белка — в серединной и С-концевой областях; взаимодействие в серединном условном M-домеене необходимо для взаимодействия С-концевого домена PCID2 с мРНК.

**Литература**

1. Glukhova A. A. et al. PCID2, a subunit of the Drosophila TREX-2 nuclear export complex, is essential for both mRNA nuclear export and its subsequent cytoplasmic trafficking // RNA biology. 2021. V. 18. No 11. P. 1969–1980.
2. Ellisdon A. M. et al. Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex // Nature Structural & Molecular Biology. 2012. V. 19. No 3. P. 328–336.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, № 22-14-00270.

© Ю. А. Вдовина, Д. В. Копытова, 2022

## ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ВИЧ-1 УСИЛИВАЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭМЕТИНА И ХЛОРОХИНА\*

В. О. Ведерникова<sup>1,2</sup>, П. В. Спирин<sup>1</sup>, Е. Ю. Широкова<sup>1</sup>, Т. Д. Лебедев<sup>1</sup>, В. С. Прасолов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт Молекулярной Биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

✉ vedernikova.vo@phystech.edu

### Аннотация

Эметин и хлорохин могут обладать противовирусным действием. Установлено, что обработка клеток злокачественной природы эметином и хлорохином в комбинации с репликационно некомпетентными лентивирусными частицами на основе ВИЧ-1 приводит к уменьшению их скорости роста и индукции апоптоза. Показано, что обработка клеток комбинацией эметина и хлорохина приводит к снижению их трансдукции лентивирусными частицами на основе ВИЧ-1.

Известно, что эметин (ЕМЕ) и хлорохин (СQ) обладают противовирусным действием. Считают, что механизм противовирусного действия основан на повышении рН кислых внутриклеточных органелл (эндосомы/лизосомы), необходимых для репликации вируса. Помимо противовирусного действия хлорохин обладает противоопухолевым эффектом. При этом механизм противоопухолевого действия также основан на изменении кислотности внутриклеточных органелл.

Молекулярные механизмы, связанные с репликацией вируса и с его цитопатическим действием, и молекулярные механизмы, регуляция которых нарушается при злокачественных перерождениях клеток, имеют общую природу (апоптоз, регуляция клеточного цикла, аутофагия). Считается, что нарушение нормальной работы этих процессов в раковых клетках повышает их чувствительность к литическому действию некоторых вирусов по сравнению со здоровыми клетками.

Известно, что вирус иммунодефицита человека ВИЧ-1 оказывает проапоптотическое и цитостатическое действие на инфицированные клетки. Однако об его онколитическом потенциале ничего не известно.

С помощью модельной системы на основе репликационно некомпетентных лентивирусных частиц ВИЧ-1 было показано, что комбинация эметина и хлорохина обладает противовирусным эффектом. Установили, что комбинация ЕМЕ и СQ существенно подавляет скорость роста клеток и усиливает апоптоз в клетках линий (A549, H1299, Jurkat, НЕК293Т), трансдуцированных репликационно некомпетентными частицами ВИЧ-1, по сравнению с клетками, обработанными только препаратами.

Таким образом, показано, что комбинация эметина и хлорохина в низкотоксичных концентрациях приводит к индукции онколитического действия репликационно некомпетентных лентивирусных частиц на основе ВИЧ-1. Данная работа может представлять интерес в контексте стратегии по перепрофилированию лекарственных средств для разработки новых подходов к лечению ВИЧ-1 и рака.

\* Результаты по исследованию жизнеспособности клеток были выполнены при поддержке гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-14-00355). Работы по получению рекомбинантных лентивирусных частиц выполнены при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект №20-04-00923).



## ТРАНСКРИПЦИОННОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ НК-КЛЕТОК В МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ\*

С. О. Вершинина, М. С. Духинова

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

### Аннотация

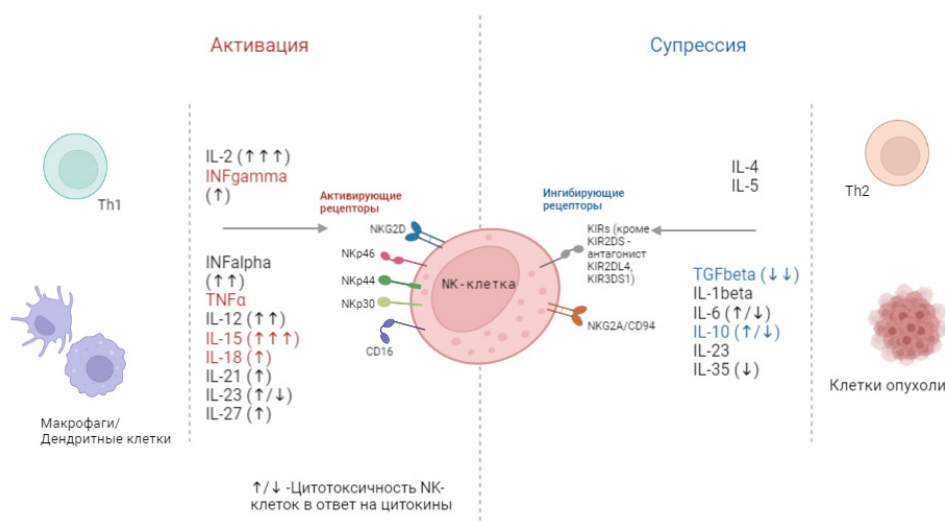
В данном исследовании проведена оценка влияния ингибитора CDK8/19 на транскрипционный фенотип клеток линии NK-92 для установления фундаментальных механизмов транскрипционной регуляции NK-клеток и поиска новых терапевтических стратегий для лечения репродуктивных патологий.

### Введение

NK-клетки — лимфоидные клетки врожденного иммунитета, осуществляющие первую линию защиты посредством прямого лизиса трансформированных клеток без предварительной реаранжировки антиген-связывающих рецепторов и клональной пролиферации [1]. Основным местом развития NK-клеток является красный костный мозг. Также NK-клетки могут дифференцироваться во вторичных лимфоидных органах: миндалинах, селезенке и лимфатических узлах; в печени и матке [2].

NK-клетки составляют гетерогенную популяцию и являются одной из популяций лимфоцитов врожденного иммунитета (ILC — innate lymphocyte cells). В настоящее время выделяют три группы ILC, к первой относят ILC 1 и NK-клетки [3, 4]. Разделение ILC на группы основано на экспрессии транскрипционных факторов, функционирующих в этих клетках, и спектре секретируемых цитокинов [5]. В дифференцировке разных стадий NK-клеток участвует спектр различных транскрипционных факторов: TOX, Eomes, GATA-3, FoxO1, Ikaros, T-bet, Aiolos [3, 4]. В настоящее время однозначно не описаны изменения экспрессии фенотипических рецепторов (CD56, CD57, CD161), рецепторов, регулирующие цитотоксическую функцию (NKp30, NKp44, NKG2A, NKG2C, KIR2DL4, KIR2DL1, KIR2DS4, KIR3DL1, KIR2DL3) и рецепторов к цитокинам (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ , VEGF), а также транскрипционных факторов субпопуляциями NK-клетками [6]. В связи с этим, процесс регуляции дифференцировки NK-клеток является малоизученным.

Активация NK-клеток тонко регулируется на молекулярном уровне, одним из участников передачи активационного сигнала являются циклин-зависимые киназы CDK8 и CDK19. Одной из наиболее важных функций этих киназ является фосфорилирование С-концевого домена РНК-полимеразы II, что определяет регуляцию инициации транскрипции, элонгации и процессинга РНК [7]. Обработка ингибиторами CDK8/19 приводит к снижению уровня фосфорилирования РНК-полимеразы II и подавлению движения полимеразы вдоль области генов. Показано, что использование ингибиторов CDK8/19 приводит к ингибированию фосфорилирования STAT1 и увеличению продукции клетками перфорина и гранзима В.



Цитокин-опосредованная регуляция активности NK-клеток

**Методы. Результаты и обсуждения. Выводы**

Методом ПЦР в реальном времени после 96-часового инкубирования клеток линии NK-92 в присутствии индуктора и низкомолекулярного ингибитора CDK8/19 выявлена зависимость уровня экспрессии цитокинов IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10 и фенотипического рецептора CD56 в NK-клетках от воздействия противовоспалительных индукторов IL-10 и TGF $\beta$ , провоспалительных индукторов IL-15, IL-18, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  и ингибитора киназ (см. рисунок).

Воздействие индукторов IL-10, TNF $\alpha$ , IL-18 сильно увеличивает экспрессию цитокинов в микроокружение, когда как от воздействия IL-15, TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  экспрессия меняется незначительно. Воздействие ингибитора киназ показывает тенденцию сохранения уровня экспрессии, а в отдельных случаях при индукции IL-18 и TNF $\alpha$  значительное увеличение уровня экспрессии цитокинов.

Установлена также зависимость уровня экспрессии активирующих рецепторов NKp30, NKp44 и ингибирующего рецептора KIR2DL4 в NK-клетках от воздействия противовоспалительных индукторов IL-10 и TGF $\beta$  и провоспалительных индукторов IL-15, IL-18, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . Активация NK-клеток цитокинами индуцирует экспрессию рецепторов на поверхность клетки. В случае NKp30 и NKp44 индукция повышает цитотоксичность NK, а в случае KIR2DL4 — ее ингибирует.

В ходе исследования проведена оценка изменений фенотипических характеристик и секреторного профиля NK-клеток в присутствии цитокинов, оценены молекулярные механизмы влияния ингибитора CDK8/19 на NK-клетки. Установлено, что ингибитор CDK8/19 оказывает селективное воздействие на экспрессию некоторых генов. Сравнительный анализ результатов позволяет заключить, что фенотип NK-клеток соотносится с их эффекторной функцией.

**Литература**

1. Farag S.S., Caligiuri M.A. // *Blood Rev.* 2006. Vol. 20, N 3. 123–137.
2. Scoville S.D., Freud A.G., Caligiuri M.A. // *Front Immunol.* 2017. Vol. 8. 360.
3. Klose C.S., Artis D. // *Nat Immunol.* 2016. Vol. 17, N 7. 765–774.
4. Spits H., Artis D., Colonna M. et al. // *Nature Reviews Immunology.* 2013. Vol. 13, N 2. 145–149.
5. Artis D., Spits H. // *Nature.* 2015. Vol. 517, N 7534. 293–301.
6. Wu Y., Tian Z., Wei H. // *Front Immunol.* 2017. Vol. 8. 930.
7. Bancerek, J., et al., CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity*, 2013. 38(2): p. 250–262.

***LTS3* GENE KNOCKOUT METHOD IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*  
UTILIZING CRISPR/CAS9\***

P. A. Virolainen<sup>1</sup>, E. M. Chekunova<sup>1</sup>, V. N. Verbenko<sup>2</sup>, I. A. Sizova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg*

<sup>2</sup>*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov  
of the National Research Center "Kurchatov Institute", Gatchina*

✉ s.pasha98@yandex.ru

**Abstract**

In this work we optimized the transformation conditions of *Chlamydomonas reinhardtii* strain CC-125 (*wt*, *mt+*) by glass beads and electroporation, and conducted a preliminary experiment on *LTS3* gene knockout with the SpCas9/sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex. According to the results, knockout of this gene in the first exon leads to the death of *C. reinhardtii* cells after several cycles of division.

The creation and analysis of organisms with knockout mutations is critical to understanding the functions of genes and the proteins they encode. The use of the CRISPR/Cas9 bacterial immunity system as a DNA editing tool greatly facilitated gene editing and knockout experiments. To date, there are 11 protocols with varying efficiency, based on the promising CRISPR/Cas genomic editing method for the green algae *C. reinhardtii*. Microalgae turned out to be a difficult object for genome editing: the high frequency of the off-target effect and DNA repair mechanisms make them genetically unstable [1]. A significant part of the difficulties has been overcome, but there is a lack of experimental studies. There is a growing interest in the world in the study of algal transcription factors (TFs), especially TFs of the GATA family. They are most actively studied in higher plants and fungi: it has been shown that GATA TFs regulate the metabolic pathways of nitrogen and carbon, as well as processes induced by light. In algae, studies of GATA TFs are limited by the results of *in silico* analyzes of genomes and transcriptomes, which only made it possible to predict protein functions and establish gene coexpression networks. At the moment, researchers are faced with the task of experimentally confirming the predicted functions.

To develop and implement the CRISPR/Cas method for editing the genome in *C. reinhardtii* in our lab, we selected the *LTS3* gene with established on pigment mutants' function [2]. *LTS3* GATA TF activates the expression of chlorophyll biosynthesis genes in the dark.

The aim of this work was to knock out the *LTS3* gene in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*.

To achieve the goal, we optimized the transformation conditions of *C. reinhardtii* cells of the wild type strain CC-125 (*wt*, *mt+*) by electroporation on a «Gene Pulser Xcell» (Bio-Rad, USA) and glass beads method (Table).

*Table 1*

**Effective conditions for transformation of *C. reinhardtii* strain CC-125 cells**

Transformation method	Transformation conditions	Transformation efficiency
Electroporation	Autolysine treatment, square waves, 300V, 6 pulses, 2 mm cuvette	11.2 %
	Autolysine treatment, square waves, 500V, 2 pulses, 4 mm cuvette	12.0 %
Glass beads	Autolysin treatment, vortexing with 500-600 g 0.45 nm glass beads for 2 rounds of 15 s and 10 s with 10 s pause	1,9 %

Next, we carried out a preliminary experiment on *LTS3* gene knockout: the SpCas9/sgRNA RNP complex and double-stranded donor DNA with paromycin-resistance gene (*aph-VIII*) coding sequence were introduced into cells by two methods of transformation. According to the results, knockout of this gene in the first exon leads to the death of *C. reinhardtii* cells after several cycles of division. It is likely that the *LTS3* gene plays a key role in the proper functioning of the chlorophyll biosynthesis process.

\* This research was funded by the Genome Research Centre development program "Kurchatov Genome Centre-PNPI" (agreement No. 075-15-2019-1663).

The optimized conditions and the developed transformation strategy will allow us to experimentally confirm the functions of other GATA TFs encoding genes found in the *C. reinhardtii* genome.

**References**

1. Ghribi M., Nouemssi S.B., Meddeb-Mouelhi F., Desgagné-Penix I. Genome Editing by CRISPR-Cas: A Game Change in the Genetic Manipulation of *Chlamydomonas* // *Life*. 2020. V. 10. P. 295–316.
2. Chekunova E.M., Savelieva N.V. LTS3 gene controls light-independent chlorophyll biosynthesis in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // *Ekologicheskaya genetika*. 2010. V. 8(2). C. 35–44.

## ИЗУЧЕНИЕ ВСТРАИВАНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПОЛИМЕРАЗ РАЗЛИЧНЫХ СЕМЕЙСТВ В РАСТУЩУЮ ЦЕПЬ ДНК

С. В. Вишнякова, А. В. Чудинов, С. А. Лапа

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

✉ svkota@mail.ru

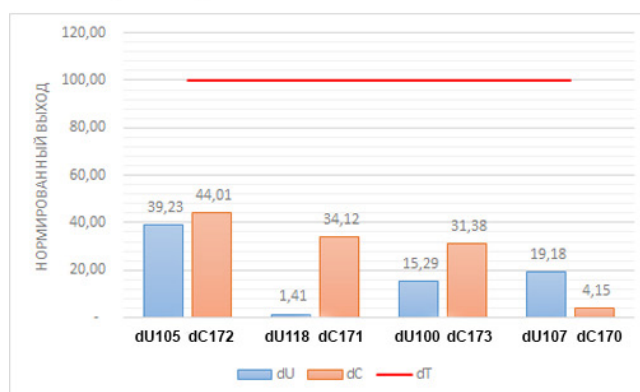
### Аннотация

Изучено субстратное поведение модифицированных трифосфатов дезоксицитидинов и дезоксиуридинов, содержащих аналогичные структурные мотивы (модификации) на гетероциклических основаниях в ПЦР с Taq и Vent(exo-) полимеразами. Выявлены различия в субстратном взаимодействии разноименных нуклеотидов с аналогичными модификациями в зависимости от природы полимеразы (принадлежность к семейству А или В).

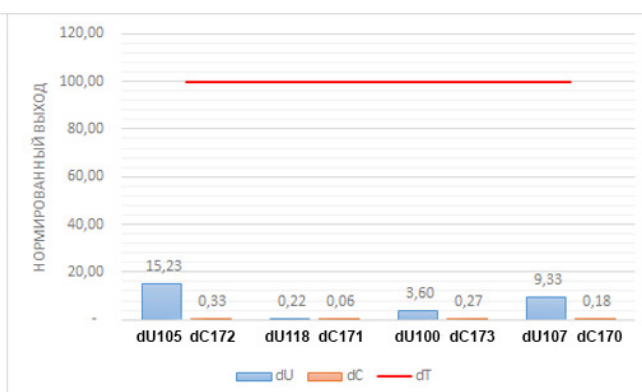
Модифицированные нуклеозидтрифосфаты нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии в качестве биозондов, аптамеров для диагностики и терапии, введения флуоресцентных меток, биосенсоров. Введение модификации в зонд способно привести к увеличению его сродства к целевой молекулярной мишени.

В работе исследована эффективность встраивания четырех пар модифицированных дезоксиуридинов и дезоксицитидинов (mod-dU и mod-dC) с аналогичными модификациями. Модификации представляли собой фрагменты 3-метилбутановой, фенилбутановой, индолэтановой, индолпропионовой кислот: dU105, dU118, dU100, dU107 соответственно, и dC172, dC171, dC173, dC170 соответственно. Проводили ПЦР с замещением природных dTTP и dCTP на модифицированные дезоксинуклеотиды с использованием полимераз Taq (семейство А) и Vent (exo-) (семейство В) с отсутствующей экзонуклеозной активностью 3'-5' для амплификации комбинаторной ДНК-библиотеки для проведения SELEX. Рассчитаны: эффективность амплификации «Е» с применением метода определения угла наклона прямого участка S-образной кривой амплификации, а также выход целевого продукта. Наличие полноразмерного продукта и выход реакции определяли по электрофореграмме (программа «Image J», США).

### Vent (exo-)



### Taq



Диаграммы нормированного выхода при встраивании модифицированных дезоксиуридинов и дезоксицитидинов с использованием Vent(exo-) и Taq полимераз. Красной линией обозначен выход при встраивании природных дезокситимидина и дезоксицитидина

Интересным результатом работы является вывод, что полимеразы не воспринимают сходным образом разноименные трифосфаты (т.е. dU и dC), модифицированные аналогичными заместителями. Выявлено, что на субстратное поведение больше влияет природа собственно трифосфата (dU и dC), чем химическая модификация. По-видимому, это связано с эволюционно более древним механизмом узнавания разноименных трифосфатов [1], чем

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-14-00257.

тонкие механизмы дифференцировки «правильный-неправильный» нуклеотид. Поэтому аналогичные с химической точки зрения модификации вовсе не воспринимаются полимеразми аналогично, если находятся на разноименных нуклеотидах. Видно (см. рисунок), что модифицированный dU может вести себя совершенно по-другому в сравнении с модифицированным той же химической группой dC. При этом «плохой» или «хороший» модифицированный субстрат часто остается таковым для различных полимераз одного семейства (неопубликованные данные), что также может объясняться более поздней филогенетической дискриминацией полимераз (например, A и B) [2] по сравнению с возникновением фундаментального механизма различия разноименных трифосфатов с образованием закрытой и открытой форм активного центра фермента [3].

Полученные результаты могут быть полезны при выборе модифицированных трифосфатов для введения меток в ДНК с помощью ферментативных реакций с применением ДНК-полимераз.

#### **Литература**

1. Tahirov T.H., Makarova K.S., Rogozin I. B. Evolution of DNA polymerases: an inactivated polymerase-exonuclease module in Pol  $\epsilon$  and a chimeric origin of eukaryotic polymerases from two classes of archaeal ancestors// *Biology direct*. 2009. V.4. P. 11.
2. Fesenko D.O., Guseinov T.O., Lapa S.A. Substrate properties of new fluorescently labeled deoxycytidine triphosphates in enzymatic synthesis of DNA with polymerases of families A and B// *Molecular Biology*. 2018. V.52, №3. P. 458–466.
3. Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site// *Nature*. 1996. №382. P.278–281.

## ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ\*

К. А. Гаптулбарова<sup>1,2</sup>, М. М. Цыганов<sup>1</sup>, М. К. Ибрагимова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

<sup>2</sup>Томский государственный университет

✉ xenia.gaptulbarova@yandex.ru

### Аннотация

Рак молочной железы (РМЖ) является не только гетерогенным солидным злокачественным новообразованием, но и крайне неоднородным по прогнозу и чувствительности к противоопухолевой терапии заболеванием. На сегодняшний день поиск маркеров для прогнозирования течения заболевания, а также поиск подхода к предотвращению рецидивов и метастазов имеет решающее значение для повышения выживаемости пациентов с трижды негативным типом (ТН) РМЖ.

Известно, что пациенты с ТН РМЖ более чувствительны к неоадьювантной химиотерапии (НХТ) и достигают хороших результатов лечения в виде полного патологического ответа. При недостижении полного патологического ответа лучший результат лечения на предоперационном сочетается с худшим прогнозом в послеоперационном периоде, более низкими показателями безрецидивной и общей выживаемости ( $p < 0,0001$ ), а также большей вероятностью возникновения рецидива заболевания. Данный феномен носит название «парадокс тройного негативного рака молочной железы».

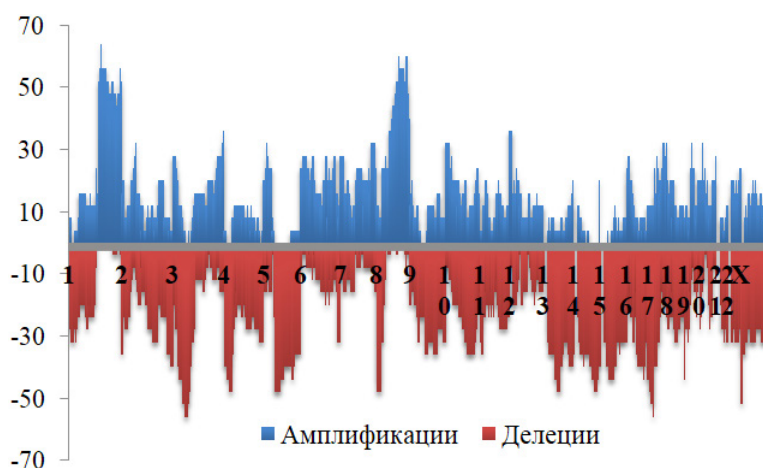
### Материал и методы

В исследование включены 25 больных с морфологически верифицированным диагнозом ТН РМЖ, средний возраст  $47,6 \pm 0,4$  лет. ДНК из биопсийного материала опухоли до лечения выделялась с использованием набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Для изучения CNA использована микроматрица высокой плотности CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Для биоинформатического анализа использовалась программа «Chromosome Analysis Suite 4.0».

### Результаты

Установлено, что наибольшее количество амплификаций (более 64,0 %) обнаружено в локусе 1q21.3 при полном отсутствии делеций в данном регионе. Наибольшая частота делеций (более 56,0 %) обнаружена в локусах 3p21.31, 3p21.2, 3p21.1 (с учетом полного отсутствия амплификаций) и 17q11.2. Обнаружены локусы с одновременным отсутствием сегментных CNA — 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.

На рисунке представлена частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме для пациенток, включенных в исследование.



Частоты делеций и амплификаций в опухоли больных ТН РМЖ

\* Работа поддержана грантом РНФ 22-25-00499.

Также изучена ассоциация ответа на НХТ с частотой встречаемости CNA до лечения. Было выделено 2 группы пациенток: группа с объективным ответом (1) — пациентки с частичной и полной регрессией опухоли после лечения ( $n = 15$ ) и группа с отсутствием ответа (2) — пациентки со стабилизацией и прогрессированием после проведения НХТ ( $n = 10$ ).

Для 1 группы пациенток показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (80,0 % и более) была также обнаружена в 1q21.3 регионе на фоне полного отсутствия делетированных участков. В то время как у больных с отсутствием ответа на НХТ в этом регионе частота амплифицированных участков не превышала 40 %. Максимальное количество делеций (66,67 % и более) в 1 группе пациентов отмечена в 17q11.2 локусе с отсутствием амплификаций в данном локусе.

Для 2 группы пациенток было установлено, что наибольшее количество амплификаций (более 60,0 %) на фоне полного отсутствия делетированных участков было обнаружено в локусах 5p15.1 и 8q22.3, в то время как у больных с объективным ответом на НХТ в этом регионе частота амплификаций не превышала 13,3 %. Максимальное количество делеций (более 70,0 %) на фоне полного отсутствия амплифицированных участков в данной группе пациенток было обнаружено в коротком плече 3 хромосомы в локусах 3p21.31, 3p21.2 и 3p21.1.

В результате сравнения частот встречаемости CNA в данных группах пациенток было показано, что наличие объективного ответа на НХТ наблюдалось при большем количестве амплификаций в 3q23 регионе, в частности, у 30 % пациенток с частичной и полной регрессией идентифицирована амплификация данного региона при полном отсутствии амплификаций в них в группе пациенток со стабилизацией и прогрессированием ( $p = 0,03$ ). Потенциально данный локус может рассматриваться в качестве предиктивного маркера хорошего ответа на НХТ у больных ТН РМЖ.



## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Т. С. Геращенко<sup>1</sup>, А. А. Щеголева<sup>1</sup>, Р. С. Воробьев<sup>1</sup>, А. А. Хозяинова<sup>1</sup>, Е. О. Родионов<sup>1</sup>, К. А. Куанышева<sup>2</sup>,  
Н. А. Шефер<sup>2</sup>, Е. Б. Топольницкий<sup>2</sup>, О. В. Панкова<sup>1</sup>, В. М. Перельмутер<sup>1</sup>, Е. В. Денисов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск  
<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск

✉ t\_gerashenko@list.ru

### Аннотация

Несмотря на значительные успехи в лечении рака легкого, основной причиной летальности от данной патологии остается высокая частота гематогенного метастазирования. В работе изучены особенности мутационного профиля немелкоклеточного рака легкого у больных с повышенным риском гематогенного метастазирования.

### Актуальность

Поиск молекулярных маркеров для предсказания вероятности прогрессирования немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) является одной из ключевых задач современной онкопульмонологии. Ранее было показано, что наличие предопухолевых изменений по типу базальноклеточной гиперплазии (БКГ) в респираторном эпителии бронхов у больных НМРЛ в отдалении от опухолевого очага увеличивает риск развития гематогенного метастазирования [1]. Причины, лежащие в основе данного феномена, непонятны.

### Цель

Провести анализ соматических генетических нарушений, ассоциированных с гематогенным метастазированием НМРЛ.

### Материалы и методы

В исследование включено 116 пациентов с НМРЛ ( $T_{1-4}N_{0-3}M_0$ ),  $59,6 \pm 8,2$  лет, срок наблюдения более 36 месяцев. Из них 58 пациентов ( $60,8 \pm 7,3$  лет) вошли в полноэкзомное секвенирование, среди которых 30 человек с наличием БКГ в респираторном эпителии бронхов на отдалении от опухоли и 28 человек с другими типами морфологических изменений либо с их отсутствием. Из свежезамороженных образцов опухолевой ткани легкого и периферической крови больных НМРЛ выделена ДНК, с помощью набора SureSelect XT Human All Exon v7 (Agilent, США) подготовлены полноэкзомные библиотеки. Секвенирование проведено на платформе NextSeq 2000 (Illumina, США). Биоинформатический анализ данных секвенирования выполнен с помощью пайплайна GATK.

### Результаты

Гематогенные метастазы выявлены в 38 % (44/116) случаев НМРЛ. Чаще всего метастазы встречались у больных с наличием БКГ по сравнению с больными с наличием других типов морфологических изменений или их отсутствием (32 % (37/116) против 6 % (7/116),  $p = 0,0047$ ). У пациентов с БКГ выявлены соматические мутации в генах *ABCB11*, *KIAA1211* и *PCDH11X*, вовлеченных в лекарственную устойчивость, ремоделирование актинового цитоскелета и межклеточные взаимодействия. Важно, что гематогенные метастазы в группе больных с БКГ встречались только в 53 % случаев (37/69), что может свидетельствовать о гетерогенности данной группы. Так, среди больных с БКГ, количество мутантных генов оказалось в 1,9 раз выше в случаях с метастазами, чем у пациентов, у которых не развились гематогенные метастазы (3081 против 1631 генов). Также у больных с БКГ и метастазами чаще встречались нарушения в генах контроля клеточного цикла, лекарственной устойчивости и ангиогенеза (*RB1*, *CDKN2A*, *ABCB1*, *ABCA13*, *VEGFC* и др.).

### Заключение

Больные НМРЛ с высоким риском гематогенного метастазирования несут нарушения в генах, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, лекарственную устойчивость и ангиогенез.

### Литература

1. Панкова О. В. Морфофункциональные особенности респираторного эпителия при немелкоклеточном раке легкого и хроническом воспалении и их связь с прогрессией опухолевого и предопухолевых процессов: дис. докт. биол. наук: 14.01.12 — НИИ им. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург, 2017. — 288с.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ И МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА ТРЕХМЕРНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ МОДЕЛИ *IN VITRO*<sup>\*</sup>

З. Е. Гилязиева, А. С. Пономарев, А. А. Ризванов, В. В. Соловьева

*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

✉ zegilazieva@gmail.com

### **Аннотация**

Мембранные везикулы — это окруженные мембраной структуры, отделяющиеся от поверхности клетки и участвующие в межклеточной коммуникации. Они способны транспортировать липиды, факторы транскрипции, мРНК, некодирующие регуляторные РНК и белки. Данные молекулы, которые переносятся везикулами, будут влиять на клетки и формирование сфероидов.

Мембранные везикулы играют роль в переносе различных веществ между клетками и создании определенного опухолевого микроокружения. Влиять на прогрессирование опухоли могут везикулы клеток, которые окружают опухоль. Поэтому цель данной работы — изучить влияние индуцированных цитохалазином В мембранных везикул (ицВмв) на опухолевые сфероиды.

В данной работе клетки аденокарциномы молочной железы (МСF7) использовались для создания опухолевых сфероидов в суспензионной культуре. Везикулы получали из двух типов клеток (МСК и клеток глиобластомы) с помощью цитохалазина В. Добавление везикул к сфероидам производилось в концентрациях 5, 10 и 20 мкг. В качестве контроля анализировали сфероиды, которые культивировались без добавления везикул. Влияние везикул анализировали с помощью световой и конфокальной микроскопии, проточной цитофлуориметрии и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Сканирующая электронная микроскопия показала, что ицВмв имеют округлую форму и разные размеры: ицВмв опухолевых клеток были больше, чем ицВмв МСК. Результаты конфокальной микроскопии подтвердили слияние везикул и клеток МСF7. Окрашивание Annexin V показало уменьшение количества жизнеспособных опухолевых клеток в сфероидах после добавления ицВмв МСК в концентрации 20 мкг. Концентрация везикул клеток глиобластомы не влияла на жизнеспособность клеток, и при 20 мкг наблюдалось небольшое увеличение жизнеспособности клеток. С помощью ПЦР-РВ было показано изменение в экспрессии генов *OCT4* и *SOX2* по сравнению с контролем после добавления ицВмв МСК.

Таким образом, в данной работе мы показали возможное влияние ицВмв на опухолевые сфероиды молочной железы человека. Для обнаружения детальных механизмов данного влияния необходимы дальнейшие исследования.

<sup>\*</sup> Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030), за счет средств Российского научного фонда (грант № 21-74-10021).

© З. Е. Гилязиева, А. С. Пономарев, А. А. Ризванов, В. В. Соловьева, 2022

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭНДОЛИЗИНОВ СТАФИЛОКОККОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ SA120 И STE134\*

Н. Н. Голосова, А. Л. Матвеев, В. В. Морозова, Ю. Н. Козлова, Н. В. Тикунова

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

✉ n.golosoვა@g.nsu.ru.

### Аннотация

Эндолизины — это белки бактериофагов, необходимые им для разрушения пептидогликанов клеточной стенки бактерий, чтобы таким образом высвободить фаговые частицы. Показано, что они могут быть использованы как антимикробные агенты. В работе были получены рекомбинантные эндолизины стафилококковых бактериофагов, обладающие пептидогликан-гидролазной активностью.

С распространением множественной резистентности бактерий к антибиотикам возрастает потребность в разработке новых антибактериальных средств. В том числе рассматривается использование в качестве антибактериальных агентов фаговых белков эндолизинов. Эти белки обладают ферментативной активностью, разрушающей пептидогликаны клеточной стенки бактерий и, следовательно, могут быть использованы как антимикробные средства, особенно при инфекциях, вызванных грамположительными бактериями.

Представители рода *Staphylococcus* являются комменсалами кожных и слизистых покровов как человека, так и животных. Однако при ослаблении иммунитета бактерии рода *Staphylococcus* способны вызывать ряд заболеваний: от незначительных кожных инфекций до опасных для жизни пневмоний, менингитов и сепсисов. Лечение стафилококковых инфекций часто осложняется образованием биопленок на поверхности пораженных участков, что также приводит к их повышенной устойчивости к антибиотикам.

В лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН были изолированы новые бактериофаги SA120 и Ste134, представители семейства *Rountreeviridae*, обладающие литической активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* соответственно, а в их геномах были выявлены гены, кодирующие эндолизины — LysSA120 и LysSte134. В ходе данной работы были получены плазмиды pQE-60\_120 и pQE-60\_134, несущие гены, кодирующие эндолизины, а также штаммы *E. coli* M15/pQE-60\_120 и *E. coli* M15/pQE-60\_134, продуцирующие эндолизины стафилококковых фагов LysSA120 и LysSte134.

Анализ свойств эндолизинов LysSA120 и LysSte134 с помощью метода зимографии показал наличие у белков гидролитической ферментативной активности относительно пептидогликана клеточной стенки ряда штаммов рода *Staphylococcus* из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. Среди них есть штаммы *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, поражающие человека и животных и обладающие антибиотикорезистентностью.

Таким образом, в ходе работы были получены штаммы-продуценты стафилококковых эндолизинов и показан широкий спектр пептидогликан-гидролизующей активности рекомбинантных эндолизинов LysSA120 и LysSte134.

\* Исследование выполнено при поддержке ФНТП 2021-1930-ФП5-8365-8981 (Соглашение 075-15-2021-1085).  
© Н. Н. Голосова, А. Л. Матвеев, В. В. Морозова, Ю. Н. Козлова, Н. В. Тикунова, 2022

## НОВЫЙ МЕТОД РАСШИРЯЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ, НЕ ТРЕБУЮЩИЙ ПРОТЕОЛИЗА

А. А. Горшкова, Л. В. Путляева, Н. В. Поварова, К. А. Лукьянов

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

✉ anastasiia.gorshkova@skoltech.ru

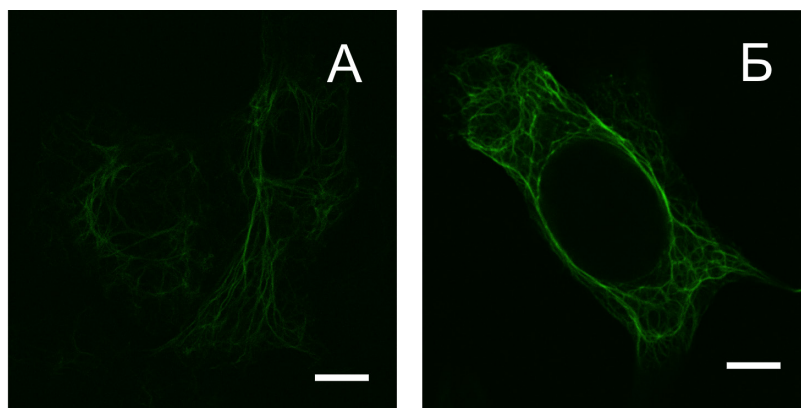
### Аннотация

Использование в расширяющей микрокопии фиксатора, содержащего S-S связи с последующим их восстановлением, позволяет избежать стадии протеолиза и значительно увеличить сохранность сигнала от флуоресцентных белков.

Световая микроскопия имеет пределы разрешения, которые не позволяют различать небольшие структуры ниже предела разрешения приблизительно в 200 нм. За последние десятилетия было разработано несколько новых подходов, позволяющих преодолеть дифракционный предел разрешения изображения, полученного с помощью флуоресцентной микроскопии. Один из таких методов — **расширяющая микроскопия (expansion microscopy)**, разработанная в 2015 г. группой ученых из MIT под руководством Эдварда Бойдена [1]. Расширяющая микроскопия не требует использования сложных микроскопов, поскольку основана на физическом расширении образца. Белки в составе образца связываются с полимерным гелем на основе акрилата натрия, который при погружении в воду линейно расширяется в 4-4,5 раза. Для того чтобы расширение происходило равномерно, после заключения в гель образцы подвергаются частичному протеолизу, что значительно снижает интенсивность сигнала при использовании флуоресцентных белков для мечения биомолекул.

Наша группа разработала новый вариант метода расширяющей микроскопии, для которой стадия частичного протеолиза не является необходимой. В качестве фиксатора мы использовали **дитиобиспропиониимидат (ДТБП)**, так как он содержит S-S связь, которая легко восстанавливается при помощи дитиотреитола (ДТТ) [2]. Мы показали, что фиксация образца в растворе ДТБП с последующей обработкой дитиотреитолом позволяет пропустить стадию расщепления белков протеазами и способствует сохранению флуоресцентных белков в образце. Мы трансдуцировали опухолевую клеточную линию HeLa Kyoto лентивирусом, несущим ген зеленого флуоресцентного белка mAvicFP1 [3], слитого с цитокератином. Клетки были зафиксированы параформальдегидом или ДТБП, и далее расширение осуществлялось по стандартному протоколу или по протоколу без протеолиза. В результате при использовании ДТБП в качестве фиксатора с восстановлением ДТТ сигнал от флуоресцентного белка оставался ярче по сравнению с контрольными образцами (рис.).

Сохранение интенсивности флуоресцентного сигнала является одной из важнейших задач оптимизации метода расширяющей микроскопии, так как яркость образца в любом случае неизбежно падает из-за физического расширения объекта. Новый метод не только обеспечивает более высокую яркость флуоресцентного сигнала, но и полностью сохраняет все клеточные белки за счет отсутствия стадий протеолиза и длительного кипячения. Это является важным преимуществом для последовательного мультиплексного анализа различных белков в одном и том же образце с помощью антител, а также для расширяющей микроскопии с использованием флуоресцентных белков, в том числе, с совмещением с методами флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения.



Изображение цитоскелета клетки, полученное при помощи расширяющей микроскопии *а* — с фиксацией параформальдегидом с последующим протеолизом; *б* — с фиксацией ДТБП без протеолиза. Изображения были получены на конфокальном микроскопе с идентичными параметрами съемки. Масштабная линейка 20 мкм

**Литература**

1. Chen F., Tillberg P. W., Boyden E. S. Expansion microscopy // *Science*. — 2015. — Т. 347. — №. 6221. — С. 543-548.
2. Liu H. et al. Dimethyl 3, 3'-dithiobispropionimidate (DTBP) as a cleavable disulfide-based polymer to encapsulate nucleic acids in biological sample preparation // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2019. — Т. 288. — С. 225-231.
3. Lambert G. G. et al. *Aequorea's secrets revealed: New fluorescent proteins with unique properties for bioimaging and biosensing* // *PLoS biology*. — 2020. — Т. 18. — №. 11. — С. e3000936.

## СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ОСОБЫМИ РЕЗИСТЕНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНОГО СОРТИНГА

Я. А. Григорьев, Т. А. Григорьева

*НИИ «Молекулярная фармакология», С  
анкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)*

✉ yagrigoiev294@gmail.com

### Аннотация

В настоящее время метод проточной цитометрии находит широкое применение в различных областях медицины и клеточной биологии, позволяя оценивать параметры клеток по их светимости. Анализ содержания флуоресцентного красителя и последовательный отбор клеток с его пониженным накоплением позволил получить штаммы клеточной линии НСТ116 с резистентным фенотипом.

Современные клеточные сортеры, позволяющие использовать возможности проточной цитометрии не только для анализа, но и для отбора интересующих исследователя клеток, могут использоваться для широкого круга задач. В данной работе при помощи сортера S3e (Bio-Rad) была осуществлена селекция клеток аденокарциномы толстой кишки человека НСТ116, обладающих повышенной способностью выбрасывать флуоресцентный краситель.

Родамин 123 является витальным митохондриальным красителем, что позволяет использовать его в исследованиях, предполагающих длительное культивирование окрашенных клеток. В данной работе окраска использовалась для отбора клеток, наиболее эффективно сопротивляющихся накоплению красителя, что свидетельствует о потенциально повышенной резистентности не только к используемому красителю, но и к широкому спектру лекарственных препаратов, взаимодействующих с клеткой аналогично родамину.

В ходе эксперимента клетки окрашивали родамином 123 на протяжении 40 мин. В качестве контроля использовали неокрашенные клетки, для детекции использовали диапазон 510-540 нм. Отбирали 5-7 % клеток с наименьшим свечением от общего количества событий с использованием ограничений по данным прямого и бокового рассеяния, а также контрольных клеток. Отобранные клетки культивировались в течение недели в среде DMEM при 5 % CO<sub>2</sub>, затем процесс повторялся.

В результате работы выявлено, что клеточная линия пятого поколения имеет значительные отличия по интенсивности накопления флуоресцентного красителя от контрольного штамма. Предполагается, что пониженные эмиссионные свойства полученных клеток связаны с повышенной активностью АВС-транспортеров, что делает их удобным объектом для изучения химиорезистентности клеток к лекарственным препаратам.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ГЕНА KRAS ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ\*

В. М. Гринвальд<sup>1</sup>, И. Ю. Деулин<sup>2</sup>, Ю. И. Хрипко<sup>2</sup>, М. В. Шипунов<sup>2</sup>, О. П. Хрипко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский областной клинический онкологический диспансер

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ grin-val@mail.ru

### Аннотация

Одними из часто исследуемых мутаций генов является группа генов семейства RAS. Ген KRAS — внутриклеточная часть сигнального каскада EGFR. В опухолях выявляют разные типы данного гена, которые кодируют «нормальный», не мутированный белок, известный как «дикий тип» KRAS и мутированный, «мутантный» KRAS. Мутации в данном гене свидетельствуют о резистентности опухоли к терапии EGFR, их отсутствие наоборот определяет высокую эффективность лечения препаратами EGFR.

### Цель

Анализ данных полученных при проведении молекулярно-генетических исследований гена KRAS у онкологических пациентов

### Материалы и методы

В качестве материала для исследований использовался биопсийный материал, полученный от пациентов в возрасте от 31 до 92 лет. Средний возраст пациентов, участвовавших в исследовании, составил 62 года. В исследование были включены 207 образцов парафиновых блоков от пациентов со злокачественными новообразованиями. Отдельную группу составили 141 образец с образованиями желудочно-кишечного тракта, из них: 71 — ободочная кишка, 56 — прямая кишка, 8 — желудок, 5 — ректосигмоидный отдел, 1 — тонкий кишечник, 1 — задний проход. Двадцать четыре случая с меланомой, двенадцать случаев первично-множественных злокачественных новообразований и одиннадцать случаев с неуточненной локализацией. Девять случаев с поджелудочной железой. С новообразованиями печени и ЖВП исследовалось пять образцов. Два случая аденокарциномы простаты. По одному образцу от пациентов с опухолью почки, тела матки, вульвы, мочевого пузыря и щитовидной железы. Выделение ДНК из парафиновых блоков проводилось с использованием набора реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки, согласно инструкции изготовителя. (БиоЛинк, Россия). Для определения мутаций методом аллель-специфичной ПЦР использовался амплификатор CFX-96 (BioRad, USA). Для исследования мутаций в протоонкогене KRAS был использован набор Real-time-PCR-KRAS-7M, согласно инструкции изготовителя. (БиоЛинк, Россия.).

### Результаты и их обсуждение

В результате исследования было получено, что ген KRAS наиболее часто встречается у пациентов со злокачественными новообразованиями ЖКТ — 36 случаев активирующей мутации и 81 случай составили дикий тип. При этом наиболее частой локализацией мутаций гена стали ректо-сигмоидный отдел (40 %), ободочная кишка (28 %), прямая кишка (25 %). Также вторыми по частоте встречаемости стали первично-множественные опухоли — 5 мутаций и 7 случаев дикого типа. Новообразования с неуточненной локализацией составили два варианта дикого типа против двух мутантных. Один мутантный вариант опухоли поджелудочной железы и один вариант дикого типа. Одна активирующая мутация была обнаружена в опухоли мочевого пузыря. В остальных образцах ген KRAS не был обнаружен.

### Выводы

В основе канцерогенеза лежит многоступенчатый процесс накопления мутаций и эпигенетических изменений, приводящих к нарушению экспрессии множества генов и, в конечном итоге, к злокачественной трансформации. Молекулярно-генетические исследования используются для оценки мутационного статуса ключевых генов, вовлеченных в передачу пролиферативных сигналов. Кроме клинического применения для оценки риска рецидива заболевания и для ранней диагностики в здоровой популяции, полученные данные помогут определить прогностические и предиктивные факторы ответа на проведение противоопухолевого медикаментозного лечения.

\* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

## АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ МТОР С РАЗВИТИЕМ НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ВМД В КОГОРТЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ\*

В. А. Девяткин, О. С. Кожевникова, А. Ж. Фурсова, А. С. Дербенёва,  
И. Ф. Никулич, М. С. Тарасов, Ю. В. Румянцева, Д. В. Телегина, Н. Г. Колосова

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

✉ devyatkin@bionet.nsc.ru

### Аннотация

Генетические факторы могут влиять на вероятность развития возрастной макулярной дегенерации и реакцию на терапию, однако имеющиеся сведения часто противоречивы в зависимости от обследуемой выборки. В данной работе была проверена связь ряда SNPs с развитием ВМД в когорте Западной Сибири с целью дальнейшего установления их влияния на эффективность лечения.

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — прогрессирующее заболевание, приводящее к снижению центрального зрения и центральной слепоте у пациентов старше 50 лет. Факторы риска включают старение, условия среды, образ жизни, генетическую предрасположенность. Понимание взаимосвязи различных факторов важно для новых стратегий прогнозирования и предотвращения прогрессирования заболевания. В настоящей работе проанализированы полиморфизмы в генах МТОР (rs2295080, rs11121704, rs1057079, rs1064261), АТG5 (rs573775), ULK1 (rs11246867, rs3088051), MAP1LC3A (rs73105013) и SQSTM1 (rs10277) в когорте Западной Сибири.

Было выполнено генотипирование с помощью аллель-специфичной ПЦР у 193 пациентов с ВМД и 147 человек из контрольной группы, рассчитаны отношение шансов (ОШ) и 95 % доверительный интервал (ДИ).

Для большинства SNP распределение генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга в обеих группах и в общей популяции, за исключением rs1057079, rs11121704 и rs2295080 в гене МТОР, для которых равновесие было нарушено в группе с ВМД ( $p = 0,036$ ,  $p = 0,044$  и  $p = 0,023$  соответственно). Эти три SNP демонстрируют достоверные различия во встречаемости генотипов между группой с ВМД и контрольной группой ( $p = 0,022$ ,  $p = 0,023$  и  $p = 0,016$  соответственно). Мы провели дальнейший анализ, чтобы определить тип наследования для каждого из этих трёх SNP.

Генотип МТОР rs1057079 С/Т был связан с повышенной вероятностью развития ВМД при кодоминантной (ОШ = 1,98; ДИ: 1,25–3,13;  $p = 0,014$ ) и сверхдоминантной (ОШ = 1,86; ДИ: 1,20–2,90;  $p = 0,0056$ ) моделях, а генотип С/Т+С/С был связан с 1,9-кратным (ОШ = 1,9; ДИ: 1,22–2,96;  $p = 0,0041$ ) увеличением шансов ВМД в доминантной модели.

Генотип МТОР rs11121704 С/Т+С/С был связан с 1,8-кратным (ОШ = 1,84; ДИ: 1,18–2,85;  $p = 0,0065$ ) увеличением вероятности ВМД в соответствии с доминантной моделью.

Генотип МТОР rs2295080 G/Т был связан с повышенной вероятностью развития ВМД при сверхдоминантной (ОШ = 1,75; ДИ: 1,13–2,71;  $p = 0,012$ ) модели, а генотип G/Т+G/G был связан с 1,9-кратным (ОШ = 1,9; ДИ: 1,22–2,96;  $p = 0,0046$ ) увеличением вероятности ВМД в доминантной модели.

В соответствии с информационным критерием Акаике (ИКА), доминантная модель была предпочтительнее во всех случаях.

Анализ неравновесия по сцеплению (LD) показывает сильную неслучайную ассоциацию всех вариантов (охватывающих область 117,5 т.п.н.) в гене МТОР. Гаплотип GCCG, соответствующий референсным аллелям rs1064261, rs1057079, rs11121704, rs2295080, был ассоциирован с 1,5-кратным (ОШ = 1,54; ДИ: 1,05–2,26;  $p = 0,029$ ) увеличением шансов ВМД по сравнению с наиболее частым гаплотипом АТТТ (58,2 %). Интересно, что для всех девяти SNPs гаплотип GCCGCTGT (rs1064261, rs1057079, rs11121704, rs2295080, rs573775, rs10277, rs3088051, rs11246867, rs73105013, соответственно) был ассоциирован с 3,1-кратным (ОШ = 3,12; ДИ: 1,07–9,13;  $p = 0,039$ ) повышением шансов ВМД по сравнению с наиболее частым гаплотипом АТТТGCTGT (15,4 %). Гаплотип GTTT снижает вероятность развития ВМД (ОШ = 0,34; ДИ: 0,17–0,70;  $p = 0,0037$ ) по сравнению с гаплотипом АТТТ.

Таким образом, возможная роль вариантов МТОР в развитии ВМД подлежит обсуждению. Дальнейшее исследование включает анализ ассоциаций SNPs с клиническими особенностями ВМД и ответом на терапию в выборке пациентов.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 21-15-00047.



**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У СТАРЫХ КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ\***Д. Ш. Джалилова<sup>1</sup>, М. В. Силина<sup>2</sup><sup>1</sup>НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына  
Российского научного центра хирургии им. академика Б. В. Петровского, Москва<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

✉ juliajal93@mail.ru

**Аннотация**

В работе исследованы уровни экспрессии генов *Hif-1a*, *Hif-2a*, *Vegf*, *Nf-κb*, *Tgf-β*, *Il-10*, *Il-1β* и *Il-6* в печени старых крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии через 6 ч после введения липополисахарида в дозе 1,5 мг / кг.

Гипоксия является одним из патогенетических факторов развития многих заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, воспалительных, инфекционных и опухолевых. Клеточный ответ на недостаток кислорода реализуется через сигнальный путь индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF [1]. Как люди, так и лабораторные животные отличаются по устойчивости к гипоксии, и характеризуются значительной индивидуальной вариабельностью уровней HIF и его зависимых генов [2, 3]. Различия в экспрессии HIF и устойчивости к гипоксии могут определять тяжесть течения локальных и системных воспалительных реакций, в том числе системного воспалительного ответа (СВО). Ранее нами показано, что у низкоустойчивых к гипоксии половозрелых крыс Вистар течение СВО более тяжелое, что во многом обусловлено более высоким уровнем экспрессии *Hif-1a*. Устойчивость организма к гипоксии и тяжесть течения СВО зависят от многих факторов, в том числе от возраста. Однако в литературе отсутствуют данные об особенностях течения СВО у организмов старшего возраста во взаимосвязи с исходной устойчивостью к гипоксии.

Цель исследования — охарактеризовать различия в экспрессии генов, регулирующих реакцию на гипоксию и воспаление, при СВО у старых крыс Вистар с разной устойчивостью к недостатку кислорода.

Устойчивость к гипоксии самцов крыс Вистар (n = 60, возраст 18 мес.) определяли в барокамере на «высоте» 11500 м. К высокоустойчивым к гипоксии (ВУ) относили крыс, время жизни (до принятия бокового положения) которых на «высоте» составляло более 240 сек. (n = 15), к низкоустойчивым (НУ) — менее 80 сек (n = 13). СВО моделировали путем внутрибрюшинного введения липополисахарида (ЛПС) *E.coli* O26:B6 (Sigma) в дозе 1,5 мг / кг. Животных выводили из эксперимента через 6 ч. после введения ЛПС. Методом ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии генов в печени.

Показано, что уровень экспрессии гена *Hif-1a* в печени старых крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии контрольных групп не различался, однако через 6 ч. после введения ЛПС у НУ крыс был значительно выше по сравнению с ВУ. Статистически значимых различий в уровнях экспрессии *Hif-2a* и *Vegf* выявлено не было. Повышение уровней экспрессии генов провоспалительных цитокинов — *Il-1β* и *Il-6* наблюдалось как у ВУ, так и у НУ к гипоксии животных через 6 ч. после введения ЛПС. При этом между ВУ и НУ крысами статистически значимых различий не выявлено. Через 6 ч. после введения ЛПС по сравнению с контрольной группой повышение уровня экспрессии противовоспалительного цитокина *Il-10* наблюдалось только у ВУ к гипоксии животных. Статистически значимых различий в экспрессии *Tgf-β* не выявлено. Таким образом, более значительное увеличение экспрессии *Hif-1a* после введения ЛПС у НУ к гипоксии старых животных на фоне увеличения экспрессии провоспалительных цитокинов и не отличающихся от контрольной группы уровней экспрессии противовоспалительных цитокинов, свидетельствует о более тяжелом течении СВО у НУ крыс по сравнению с ВУ. Полученные данные необходимо учитывать при разработке новых персонализированных подходов к терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц пожилого возраста.

**Литература**

1. Semenza, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics // *Oncogene*. 2010. V. 29. P. 625–634. doi: 10.1038/onc.2009.441.
2. Kirova Y. I., Germanova E. L., Lukyanova L. D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1α levels in rat neocortex in different hypoxia regimens // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. V. 154. P. 718–722. doi: 10.1007/s105170132038z.
3. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. 2013. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* 2013. V. 14. P. 65–77. doi: 10.1089/ham.2012.1064.

\* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых ученых МК-2573.2022.1.4 «Прогнозирование течения системной воспалительной реакции у старых крыс на основе исходной устойчивости к гипоксии».

## ОПУХОЛЕ-АССОЦИИРОВАННЫЕ miR-24 И miR-101 В СОСТАВЕ ЭКСОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ И АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ\*

Е. И. Джугашвили<sup>1</sup>, А. И. Яловая<sup>2</sup>, И. А. Рекеда<sup>3</sup>, С. Н. Тамкович<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup>Новосибирский областной клинический онкологический диспансер

✉ e.dzhugashvili@g.nsu.ru

### Аннотация

Экзосомы являются секретруемыми различными клетками внеклеточными везикулами диаметром 30–150 нм, несущими белки и нуклеиновые кислоты (преимущественно РНК) [1]. Экзосомы играют ключевую роль в межклеточной коммуникации, сливаясь с мембраной клетки-реципиента или взаимодействуя с рецепторами на ее поверхности и высвобождая биоактивные молекулы. Как часть опухолевого микроокружения, экзосомы участвуют в клеточной пролиферации, ангиогенезе, метастазировании, иммунной регуляции, формировании преметастатической ниши и устойчивости к препаратам [2]. Выявлено, что экзосомы присутствуют в большинстве биологических жидкостей, в том числе в крови и асцитической жидкости. По сравнению с клетками экзосомы содержат значительное количество микроРНК. Важно, что экзосомальные микроРНК защищены от деградации, функциональны и могут влиять на экспрессию генов в клетках-мишенях [1].

Большинство пациентов с раком яичников (РЯ) диагностируются на поздних стадиях, при этом у 70 % пациентов обнаруживаются метастазы в лимфатических узлах и асцитическая жидкость. Для таких больных характерны низкая эффективность лечения и высокая смертность.

Целью работы являлось оценить уровень опухоле-ассоциированных микроРНК в экзосомах из плазмы крови и асцитической жидкости первичных больных с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) и диссеминированным РЯ IIIВ-IIIС стадии для поиска перспективных экзосомальных маркеров жидкой биопсии.

Для исследования уровня опухоле-ассоциированных микроРНК экзосомы из плазмы крови и асцитической жидкости первичных больных с ПОЯ и диссеминированным РЯ IIIВ-IIIС стадии (n = 13) и экзосомы из плазмы крови здоровых женщин (n = 19) выделяли методом ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием. Экзосомальную природу везикул подтверждали трансмиссионной электронной микроскопией и проточной цитофлуориметрией на латексных частицах с использованием антител против CD9, CD24, CD63 и CD81 (BD Biosciences, США). Уровень микроРНК в составе экзосом оценивали после выделения РНК набором BioSilica (Россия), концентрирования переосаждением с гликогеном и проведения ПЦР в режиме «реального времени» с использованием наборов BioLabmix (Россия), полученные данные нормировали на уровень miR-16. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0. Данные проанализированы на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро – Уилка. Все данные выражены как медианы с межквартильным размахом. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни и критерия Крускала – Уоллиса. Различия считали достоверными при значениях  $p \leq 0,05$ .

Выявлено достоверное изменение уровней miR-24 и miR-101 в составе экзосом плазмы крови онкологических больных по сравнению со здоровыми женщинами (медиана -3,39 против -6,39,  $p = 0,008$  и 8,83 против 7,57,  $p = 0,008$ , соответственно). Выявлена достоверная корреляция уровней опухоле-ассоциированных микроРНК miR-24 и miR-101 в плазме крови и в асцитической жидкости больных РЯ (коэффициент Спирмена  $R=0,9987$ ,  $p < 0,01$  для обоих случаев).

### Литература

1. Юнусова Наталья Валерьевна, Кондакова Ирина Викторовна, Коломиец Лариса Александровна, Молчанов Сергей Валерьевич Протеасомы и экзосомы при раке яичников: связь с особенностями клинического течения и прогнозом // Сибирский онкологический журнал. 2014. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/proteasomy-i-ekzosomy-pri-rake-yaichnikov-svyaz-s-osobennostyami-klinicheskogo-techeniya-i-prognozom> (дата обращения: 11.08.2022).
2. Shen J, Zhu X, Fei J, Shi P, Yu S, Zhou J. Advances of exosome in the development of ovarian cancer and its diagnostic and therapeutic prospect. *Onco Targets Ther.* 2018 May 15;11:2831-2841. doi: 10.2147/OTT.S159829. PMID: 29844681; PMCID: PMC5961474.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта ИХБФМ СО РАН № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».

## МЕХАНИЗМЫ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕСТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО СТВОЛОВЫХ\*

Д. С. Долгашева<sup>1</sup>, Е. А. Здерева<sup>1</sup>, И. А. Цыденова<sup>1</sup>, К. А. Гаптулбарова<sup>1</sup>,  
М. К. Ибрагимова<sup>1</sup>, К. В. Невская<sup>2</sup>, Н. В. Литвяков<sup>1</sup>, А. Г. Першина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, Томск

<sup>2</sup> Центр биологических исследований и биоинженерии ЦНИЛ СибГМУ, Томск

✉ normikus.18.97@gmail.com

### Аннотация

Известно, что способность к дедифференцировке у нестволовых клеток определяет злокачественность опухоли и ее способность метастазировать [1]. Отсутствием способности к дедифференцировке и индукции полноценного стволового фенотипа объясняется неспособность опухолей метастазировать в пределах одной локализации. Целью работы явилось изучение механизмов регуляции дедифференцировки опухолевых нестволовых клеток в опухолевые стволовые на моделях *in vitro*.

### Материалы и методы

Стабильные клеточные линии рака молочной железы (BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 и T47D) культивировали в стандартных условиях. CNA-генетического ландшафта и транскриптом клеток исследовали на микрочипах CytoScan HD Array и Clariom S Assay. Субпопуляционный состав клеточных линий изучали на проточном цитометре. Отбор клеток, отрицательных по CD44 проводился на приборе Sony SH800. В работе использовали ингибиторы генов *TERT* (BIBR1532), *MYC* (10058-F4) и *NOTCH1* (FLI-06).

### Результаты

Все клеточные линии, кроме BT-549, несут две и более амплификации генов стволовости. Основную массу MCF-7 составляют прогениторные опухолевые клетки (ПОК — CD44+CD24+), дифференцированные опухолевые клетки (ДОК CD44-CD24-/+ ) составляют 13 %. SK-BR-3 и BT-549 содержат в основном ДОК 2-го порядка (CD44-CD24-). У T47D общее количество ДОК 1 и 2 поколения — 29 %. Показано, что клетки MCF-7 дикого типа спонтанно образуют маммосферы без индукции IL6 на 14 сутки роста, но в присутствии IL6 на 14 и 21 сутки наблюдается большее количество крупных маммосфер. ДОК MCF-7 без IL6 образуют мелкие сфероиды на 21 день, а с IL6 на 14 сутки. Сравнение экспрессии генов стволовости на 3 и 21 сутки показало, что первоначально, в группе ДОК+IL6 линии MCF7, снижается в 2 и более раза экспрессия *VIM*, *TERT* и *LNMB2* и повышается активность *KLF4*. На этапе маммосферообразования (21 сутки) в группе ДОК+IL6, усиливается экспрессия *LMNB2*, *SOX4*, *FZD1*, *MYC*, *BMI1*, *KLF5*, *SMAD9*, *SMAD4*, *SMAD2*, *HIF3A* и снижается *DPPA4*, *SNAI2*, *SOX1*, *FLT3*. Экспрессия *MYC* активируется при маммосферообразовании во вторую фазу на 21 сутки. Действие IL6 на клетки дикого типа и ДОК различно. У дикого типа на третьи сутки IL6 активирует экспрессию *SOX2*, *TERT* и ингибирует *PIM1*. *SOX2* запускает деление ОСК, что приводит к маммосферообразованию. В ДОК на третьи сутки IL6 снижает экспрессию *LMNB2*, *VIM* и *SMAD9*. На 21 сутки IL6 в клетках дикого типа активирует экспрессию *DPPA4*, *SOX1*, *SMO*, *MOB3B*, *LAT* и ингибирует *KLF5*, *KLF4*, *MYC*, *LNMB2*, *SMAD2*, *SMAD4*, *BMI1*, а в ДОК активирует *SMAD9*, *SMAD2*, *KLF6*, *BMI1*, *MYC* и ингибирует *FLT3*, *DPPA4*, *SNAI2*. Эксперимент с T47D показал, что в группе ДОК сфероиды образуются без IL6 на третьи сутки, а на седьмые сутки — полноценные маммосферы. На 21 сутки маммосфер в группе с ДОК меньше, чем в контроле, при этом клеточная масса в контроле ДОК больше. Ингибиторы BIBR1532 и 10058-F4 блокируют дедифференцировку ДОК T47D до ОСК. BIBR1532 и 10058-F4 блокируют активность ОСК в клетках дикого типа. FLI-06 снижает дедифференцировку ДОК до ОСК. FLI-06 также снижает активность ОСК в культурах дикого типа и блокирует пролиферацию и дедифференцировку ДОК до ПОК. Комплекс ингибиторов в ДОК T47D подавляет дедифференцировку до ОСК и ПОК. BIBR1532 подавляет экспрессию 11 генов стволовости (*MYC*, *FZD9*, *NANOG*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FZD1*, *SMO*, *MOB3B*, *ITGB1*, *BMI1*, *TGFBR1*), из них два амплифицированы у T47D (*MYC* и *FZD9*), и активирует *KLF6* и *LAT*. Ингибитор 10058-F4 подавляет *MYC*, *NANOG*, *FZD9*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *PIM1* и повышает активность *SOX2*, *KLF4*, *KLF6*, *KLF1*, *SMAD2*, *SMAD9*, *LIFR*, *LNMB2*, *ZEB1*, *BMP6*, *HIF3A*. FLI-06 снижает в два раза и более экспрессию *VIM*, *DPPA4* и *FZD9* и не препятствует дедифференцировке ДОК. Все три ингибитора подавляют более чем в два раза экспрессию *NANOG*, *LNMB2*, *LIFR*, *MYC*, *ZIC2*, *KLF6*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *FZD9*, *BMI1*, *SMAD4*, *ITGB1*.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 21-15-00243.

**Заключение**

Показано, что гены стволовости играют ключевую роль в механизмах дедифференцировки. В процессе дедифференцировки происходит ингибирование EMT и активация экспрессии ключевых генов стволовости. Подавление экспрессии генов стволовости предотвращает дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток до прогениторных и стволовых. Химические ингибиторы в комплексе показали эффективную блокировку дедифференцировки опухолевых клеток линии T47D.

**Литература**

1. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions //Cancer discovery. — 2022. — Т. 12. — №. 1. — С. 31-46.

## ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ АПТАМЕРОВ С КЛАСТЕРАМИ БОРА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ\*

О. А. Должикова<sup>1,2</sup>, М. И. Мещанинова<sup>1</sup>, Д. С. Новопашина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ o.dolzhikova@g.nsu.ru

### Аннотация

Кластеры бора являются перспективными препаратами для бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ). Одним из возможных путей доставки их в целевые клетки является присоединение кластеров бора к аптамерам, способным избирательно проникать в опухолевые клетки. В данной работе получены конъюгаты аптамеров, способных проникать в клетки глиомы, с кластерами бора и исследовано влияние введенных кластеров бора на свойства аптамеров, с целью оценки возможности применения таких конъюгатов в терапии.

Перспективным подходом к лечению опухолей мозга является бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ), основанная на облучении опухолевых клеток, насыщенных изотопом бора-10, потоком эпитепловых нейтронов. Одним из ключевых моментов при БНЗТ является доставка в клетки опухоли достаточного количества бора-10. Введение соединений бора в состав конструкций на основе нуклеиновых кислот, таких как, например, аптамеры, позволяет создавать новые перспективные препараты для БНЗТ [1]. Введение сразу нескольких кластеров бора в состав олигонуклеотидных конструкций позволит повысить концентрацию бора-10 в клетках.

Целью данной работы являлась разработка нового подхода к введению нескольких кластеров бора на 5'-конец олигонуклеотидных конструкций и исследование влияния кластеров бора на свойства таких конъюгатов.

В этой работе мы синтезировали конъюгаты модельных олигодезоксирибонуклеотидов и аптамеров, несущие на конце тетрамер, содержащий четыре остатка *клозо*-додекабората. Для их синтеза нами был адаптирован метод, разработанный ранее в нашей лаборатории [2] и подразумевающий активацию концевой гидроксильной группы иммобилизованного на твердой фазе олигонуклеотида дисукцинимидилкарбонатом (ДСК) с последующим взаимодействием с тетрамером. Этот подход позволяет в одну стадию с достаточно хорошей эффективностью вводить сразу четыре остатка *клозо*-додекабората на 5'-конец олигонуклеотидной конструкции.

Провели сравнительное исследование физико-химических свойств модельных конъюгатов 20-ти звенных олигодезоксирибонуклеотидов с одним остатком *клозо*-додекабората, введенным на 5'-конец олигонуклеотида, и с четырьмя остатками *клозо*-додекабората, введенными в составе тетрамера на 5'-конец олигонуклеотида. Показано, что введение четырех кластеров бора уменьшает термическую стабильность дуплексов модельных олигонуклеотидов с комплементарным 20-ти звенным олигодезоксирибонуклеотидом, при этом их влияние на гидрофобность олигонуклеотидов оказалась незначительной.

Нами были получены конъюгаты двух аптамеров с тетрамером, содержащим четыре остатка *клозо*-додекабората на 5'-конце. Был обнаружен необычный эффект, при введении одного кластера бора в состав аптамеров гидрофобность возрастала, но при введении четырех кластеров бора снова падала до значений, близких к исходным.

Предложенный подход может быть использован для создания перспективных препаратов для БНЗТ на основе аптамеров.

### Литература

1. Novopashina D.S., Vorobyeva M.A., Venyaminova A. Recent Advances in the Synthesis of High Boron-Loaded Nucleic Acids for BNCT // Front Chem. 2021 V.9. P.619052.
2. Meschaninova M.I., Novopashina D.S., Semikolenova O.A., Silnikov V.N., Venyaminova A. G. Novel Convenient Approach to the Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Conjugates // Molecules. 2019 V.24. N.23. P.4266.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 19-74-20127.

© О. А. Должикова, М. И. Мещанинова, Д. С. Новопашина, 2022

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА I ТИПА И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ГОРМОНПОЗИТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\*

Т. А. Дронова<sup>1</sup>, Н. Н. Бабышкина<sup>1</sup>, Е. М. Слонимская<sup>2</sup>, Н. В. Чердынцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, Томск

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

✉ tanyadronova@mail.ru

### Аннотация

Особенности течения рака молочной железы (РМЖ) определяются молекулярно-генетическими характеристиками опухолевых клеток. Цель работы состояла в изучении частоты встречаемости полиморфного локуса (SNP) rs334354 гена *TGF-βR1*, анализе его транскрипционной активности, а также их сопоставлении с основными клинико-морфологическими параметрами гормонпозитивного рака молочной железы (РМЖ). В ходе исследования показано, что мутантный генотип и аллель rs334354 гена *TGF-βR1* ассоциирован с более благоприятными клиническими характеристиками заболевания.

### Актуальность

Известно, что однонуклеотидная замена в интронной области rs334354 гена *TGF-βR1* может приводить к его высокой транскрипционной активности, тем самым усиливая TGF-β1/Smad антипролиферативные сигналы в опухолях молочной железы [1].

### Цель

Анализ связи экспрессии гена *TGF-βR1* и SNP *TGF-βR1* (rs334354) с основными клинико-морфологическими параметрами опухоли (размер опухолевого узла, наличие метастазов в регионарные лимфоузлы, молекулярный подтип опухоли).

### Материалы и методы

В работе проанализирован 141 парный образец опухолевой и прилегающей ткани, полученный от пациентов с диагнозом гормонпозитивного РМЖ. Уровень транскрипционной активности гена *TGF-βR1*, а также частота встречаемости генотипов и аллелей исследуемого полиморфного локуса rs334354 изучены с использованием ПЦР в режиме реального времени. Статистическая обработка результатов проведена при помощи пакета программ «STATISTICA 8.0» и SPSS 21.0.

### Результаты

Анализ частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфного локуса rs334354 гена *TGF-βR1* в зависимости от размера опухоли показал значимое преобладание мутантного аллеля А у пациентов с малым размером опухолевого узла (T1) ( $p = 0,033$ ). Кроме того, наличие как аллеля А в локусе rs334354, так и генотипа АА ассоциировано с отсутствием метастатического поражения регионарных лимфатических узлов ( $p = 0,039$  и  $p = 0,006$ ; соответственно). Носителей мутантных аллелей и генотипов rs334354 гена *TGF-βR1* было больше среди пациенток с люминальным А подтипом по сравнению с люминальным В подтипом РМЖ ( $p = 0,007$  и  $p = 0,017$ ; соответственно). При изучении экспрессии мРНК гена *TGF-βR1* у больных РМЖ с разными генотипами, показано, что носительство мутантных вариантов как генотипа АА, так и аллеля А ассоциировано с высокой транскрипционной активностью гена *TGF-βR1* ( $p = 0,015$  и  $p = 0,024$ , соответственно).

### Выводы

Носительство мутантных вариантов гена *TGF-βR1* может рассматриваться в качестве потенциального молекулярно-генетического маркера благоприятного клинического течения гормонпозитивного РМЖ.

### Литература

1. Liu X., Shan Y., Xue B. Int7G24A polymorphism (rs334354) and cancer risk // Arch Med Sci. 2013. V. 9, N. 1. P. 3–7.

\* Работа поддержана грантом РФФ, Соглашение 19-75-30016.

© Т. А. Дронова, Н. Н. Бабышкина, Е. М. Слонимская, Н. В. Чердынцева, 2022

## МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ НОКДАУНА ГЕНОВ

М. В. Дубовиченко<sup>1</sup>, Г. А. Бобков<sup>1</sup>, М. Батса<sup>1</sup>, Д. М. Колпашиков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Университет Центральной Флориды, США

✉ dubovichenko@scamt-itmo.ru

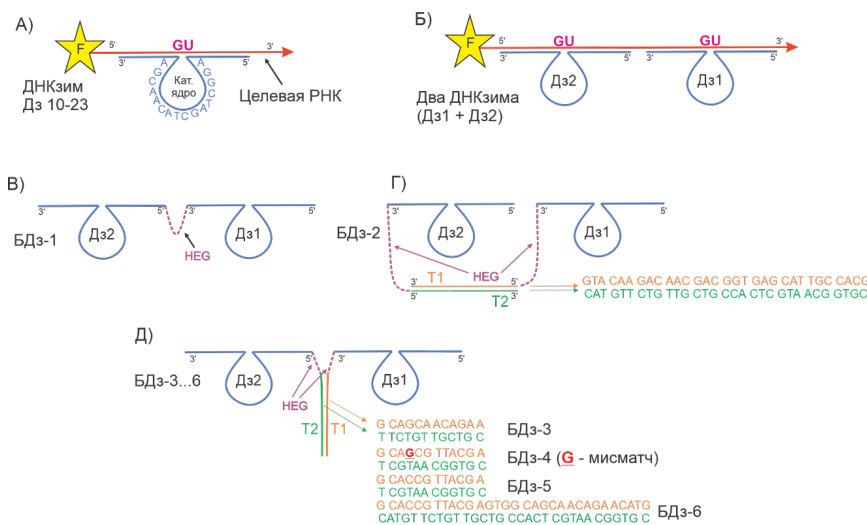
### Аннотация

На основе ДНКзимов Дз 10-23 мы разработали бивалентные ДНК-устройства, которые способны расщеплять РНК в сложных участках, недоступных для взаимодействия классических Дз 10-23. В работе были изучены особенности, влияющие на их эффективное взаимодействие с РНК, а именно размер РНК-связывающих доменов и активность каждого из них.

Нокдаун генов — один из способов лечения заболеваний на уровне экспрессии генов. Перспективность этого подхода обуславливается своим селективным действием на участок гена, ответственного за болезнетворный процесс. Уже сейчас подобный подход используют для борьбы с такими сложными заболеваниями как спинальная мышечная атрофия, миодистрофия Дюшена, а также COVID-19 [1]. В качестве терапевтических агентов для нокдауна генов используются т. н. терапевтические нуклеиновые кислоты (ТНК), включающие в себя малые интерферирующие РНК (миРНК), антисмысловые нуклеотиды (АСО), ДНКзимы Дз 10-23, векторы и гайд-РНК-зависимые нуклеазы (Cas13) [1].

Несмотря на широкий ассортимент существующих ТНК, они обладают недостатками, которые значительно усложняют разработку и внедрение в применение таких лекарств. Одним из недостатков является их низкое сродство к сложным участкам РНК целевых генов, свернутых во вторичную и третичную структуру, или находящихся во взаимодействии с белками. Низкое сродство приводит к необходимости использовать дорогостоящие химически модифицированные олигонуклеотиды, повышающие сродство, или точный, но трудоемкий анализ подходящих мишеней для эффективного действия ТНК [2, 3].

В нашей работе мы использовали подход бивалентных ТНК на основе ДНКзимов (БДз), состоящих из двух таких, объединенных в одной молекуле. Бивалентные ТНК обладают мультивалентностью — особенностью терапевтической молекулы, состоящей из нескольких активных лигандов, прочно связываться ими с одной или несколькими целевыми молекулами. При этом эффективность взаимодействия оценивается не сродством (афинностью), а avidностью, что является «суммой» сродства каждой активной субъединицы в составе лекарства к молекулам-мишеням.



Мы разработали шесть дизайнов БДз, отличающихся по способу ассоциации ДНКзимов (Дз) между собой (рис.). Исследования проводились в условиях *in vitro* с использованием околофизиологического буфера (50 mM KCl, 50 mM HEPES, 15 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7.4) и в трех временных точках: 1, 5 и 24 часа. Оценка расщепления проводилась числом оборотов (ч<sup>-1</sup>), являющееся концентрацией продукта [P] деленное на произведение концентрации фермента [E] на время (t). В качестве мишени мы использовали фрагмент РНК гена *strA* длиной 58 нуклеотидов с устойчивой вторичной структурой ( $dG = -23.60$  кДж/моль). Из всех шести вариантов дизайн БДз-1 с ковалентно связанными между собой Дз оказался наиболее активным, как по сравнению с классическими ДНКзимами, так и по сравнению с другими бивалентными модификациями БДз-2...БДз-6: 0,89 ч<sup>-1</sup> против 0,17 ч<sup>-1</sup>, 0,45 ч<sup>-1</sup>, 0,35 ч<sup>-1</sup>, 0,54 ч<sup>-1</sup> и 0,78 ч<sup>-1</sup>, соответственно.

Далее мы провели кинетический анализ БДз-1, как лучшего БДз и сравнили его действие с оптимизированными Дз1 и Дз2 с увеличенными РНК-связывающими доменами, работающими по отдельности и кооперативно. Эксперимент проводился также в условиях *in vitro* в течение 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 и 24 часов. Несмотря на большую длину РНК-связывающих доменов у оптимизированных Дз1 и Дз2, БДз-1 превзошел их в действии: за 3 часа инкубации БДз-1 расщепил РНК на величину, равную плато расщепления РНК кооперативно работающих Дз1 и Дз2 через 24 часа (42 %).

Полученные результаты позволяют полагать, что внедрение мультивалентности в дизайн ТНК позволит эффективно расщеплять РНК целевых генов в её сложных участках. В дальнейшем наши исследования планируется расширить в тестировании наших БДз в расщеплении полноразмерных РНК целевых генов в условиях *in vivo*.

#### Литература

1. Kulkarni J.A. et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics // Nat. Nanotechnol. Springer US, 2021. Vol. 16, № 6. P. 630–643.
2. Wang Y. et al. A biologically stable DNAzyme that efficiently silences gene expression in cells // Nat. Chem. Springer US, 2021. Vol. 13, № 4. P. 319–326.
3. Bennett C. F. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age // Annu. Rev. Med. 2019. Vol. 70. P. 307–321.



**ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРАНСПОЗИЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА\***

М. В. Дудников, П. Ю. Меркулов, А. А. Соловьев, И. В. Киров

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва*

✉ max.dudnikov.07@gmail.com

**Аннотация**

Мобильные элементы (МЭ) играют важнейшую роль в эволюции и адаптации растений. Однако из-за потенциальных негативных эффектов от инсерций МЭ, клетка располагает широким набором молекулярных механизмов для подавления активности МЭ. При этом некоторые МЭ могут экспрессироваться, преодолевая системы защиты клетки. Какие существуют геномные и транскриптомные особенности экспрессирующихся МЭ и приводит ли транскрипция МЭ к транспозиции — вопросы, на которые мы пытаемся найти ответ на примере МЭ подсолнечника (*Helianthus annuus* L.).

Мы идентифицировали 44 транскрибирующихся МЭ в геноме подсолнечника и продемонстрировали их отличительные геномные особенности: более позднее время вставки, большую длину открытой рамки считывания (ORF) и меньшее расстояние до соседних генов. Прямое нанопоровое секвенирование полноразмерной РНК МЭ выявило сложные паттерны альтернативного сплайсинга, что приводит к изоформам, которые несут ORF для различных белков МЭ. Большинство экспрессирующихся МЭ демонстрируют различия в количестве копий среди сортов подсолнечника. Для понимания закономерностей новых инсерций МЭ нами проведено полногеномное нанопоровое секвенирование и определены новые инсерции МЭ и их метилирование в генотипах подсолнечника российской селекции. Наше исследование демонстрирует, что десятки МЭ подсолнечника со специфической геномной организацией формируют часть транскриптома, указывая на эволюцию специфических стратегий, которые обходят существующие механизмы защиты генома.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-64-00076.  
© М. В. Дудников, П. Ю. Меркулов, А. А. Соловьев, И. В. Киров, 2022

**ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ФУНКЦИЙ SSB БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ T4 И T5\***К. С. Евменов<sup>1</sup>, Н. А. Пустогаров<sup>1,3</sup>, Д. Ю. Пантелеев<sup>2</sup>, Е. З. Алкалаева<sup>1,3</sup><sup>1</sup>*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*<sup>2</sup>*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва*<sup>3</sup>*Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва*

✉ kevmenov@mail.ru

**Аннотация**

SSB белки — участники цикла репликации бактериофагов. Связываясь с одноцепочечными молекулами ДНК, они предотвращают образование термодинамически более выгодного дуплекса ДНК, тем самым стабилизируя критически важное для эффективной репликации состояние.

Нами было проведено исследование функциональной активности SSB белков бактериофагов T4 и T5. Полученные данные, указывают на наличие дополнительных функциональных свойств этих белков.

Белки бактериофагов традиционно являются объектом исследования в молекулярной биологии. Многие из рутинно используемых ферментов были выделены именно из бактериофагов. В связи с этим актуальным является поиск и изучение функций белков бактериофагов. В данной работе были исследованы SSB-белки, основная функция которых — связывание с одноцепочечной ДНК и предотвращение образования ДНК-дуплекса. Такая активность критически важна для эффективной репликации, так как после расплетения двухцепочечной ДНК ферментом хеликазой одноцепочечные фрагменты стремятся вернуться в термодинамически более выгодное состояние дуплекса, которое препятствует работе ДНК-полимеразы.

Нами было проведено исследование функциональной активности SSB-белков бактериофагов T4 и T5, проведен анализ возможных функций этих белков, а также их сравнение. В то время как SSB-белок бактериофага T4 хорошо изучен, а препараты этого белка широко используются в молекулярной биологии, SSB-белок бактериофага T5 был описан сравнительно недавно, комплексного исследования его функций не проводилось. Гель-шифт анализ позволил подтвердить наличие функции связывания с оцДНК и оцРНК у белка T4, в то время как предполагаемый SSB-белок бактериофага T5 такой активностью не обладал. Нами была подтверждена описанная ранее способность SSB-белков усиливать активность экзонуклеаз бактериофагов. Так, при инкубации экзонуклеаз бактериофагов T4 и T5 с соответствующими SSB-белками наблюдалось ярко выраженное усиление экзонуклеазной активности.

Тесты хеликазной активности позволили обнаружить способность SSB-белка бактериофага T4 к расплечению дцДНК, тогда как белок бактериофага T5 такой активности не показал. Также было проведено исследование способности SSB-белков дестабилизировать двухцепочечные ДНК. Оказалось, что в присутствии SSB-белков бактериофагов T4 и T5 заметно снижается температура плавления коротких молекул дцДНК. Интересно, что подобная активность SSB-белка бактериофага T5, в отличие от T4, наблюдалась и при 65°C, что указывает на его термостабильность, а сам белок может стать перспективным объектом для дальнейшего использования его в различных прикладных задачах молекулярной биологии.

\* Данная работа была поддержана грантом 075-15-2019-1660 от Министерства науки и высшего образования РФ.

## ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХЛОРОФИЛЛИНА

Н. А. Елизарьев

*Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток*

E-mail: n.elizarev@m.tgmu.ru

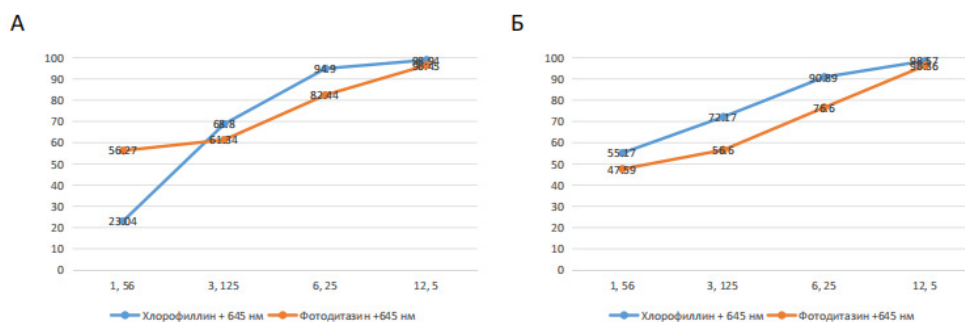
**Аннотация**

Хлорофиллин — фотосенсибилизатор природного происхождения, который является производным хлорофилла. Данное вещество хорошо накапливается в клетках, провоцируя апоптические процессы.

Согласно статистическим данным, представленным МНИОИ им. П. А. Герцена за 2021 г., количество смертей от злокачественных новообразований составляет 199 случаев на 100 000 населения. Одним из способов лечения злокачественных новообразований является фотодинамическая терапия (ФДТ). ФДТ — одобренный клинически и быстро развивающийся метод лечения рака кожи, горла, мочевого пузыря, головы и шеи, легких. Большую распространенность в практической деятельности получили фотосенсибилизаторы (ФС) природного происхождения, одним из таких является хлорофиллин, производный от хлорофилла. Данное вещество быстро накапливается в опухолевой ткани, имеет высокую фотодинамическую активность и терапевтическую эффективность [1, 2].

Исследование проводилось на асцитных клетках аденокарциномы Эрлиха, доведенных до концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл, которые инкубировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки и 0.05 % гентамицина. Клетки были разделены на 4 группы: 1 группа — контрольные необлученные клетки, 2 группа — после облучения красным светом длиной волны 645 нм в течение 15 мин, 3 группа — необлученные после контакта с хлорофиллином и фотодитазином (активный компонент хлорин еб) в различных концентрациях, 4 группа — после контакта с указанными веществами и облученные, после чего все клетки инкубировали при 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток после воздействия хлорофиллина и фотодитазина проводилась на 1 и 3 сутки путем окрашивания образцов флуоресцентным ДНК-маркером 7-AAD (Biolegend, USA) и флуоресцентным детектором мембранного потенциала митохондрий Jc-1 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA), с последующим анализом клеток на проточном цитофлуориметре MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Так же проводились исследования на цитотоксичность с помощью МТТ-теста (Sigma Aldrich, США) и генотоксичность методом щелочного кометного анализа. Для обсчета методом ASCGE использовалась программа CaspLab (Польша).

При исследовании цитотоксичности методом МТТ-теста (Sigma Aldrich, США) в качестве эффективных доз были выбраны следующие: 1.56; 3.125; 6,25; 12,5 мкг/мл. При анализе жизнеспособности клеток с помощью проточного цитофлуориметра и ДНК-маркера 7-AAD на 1 и 4 сутки средние показатели составили 71.42 % / 79.2 % мертвых клеток при воздействии хлорофиллина в различных дозировках с облучением и фотодитазина в аналогичных дозировках с облучением 74.13 % / 69.3 % соответственно (см. рисунок).



Количество мертвых клеток при воздействии хлорофиллина и фотодитазина вместе с излучением *a* — на 1 сутки и *б* — на 4 сутки

На основании сравнительного параметра TailLength на 3 сутки при воздействии хлорофиллина в дозе 6,25 мкг/мл и облучения длина «хвоста» кометы (подтверждающая степень поврежденности ДНК) составила 472 единицы, в то время как для хлорина еб 239 ед. Контрольные показатели для облученных и необлученных клеток составили 154 и 133 единицы соответственно.

Результаты проведённых экспериментов подтверждают перспективу дальнейших исследований хлорофиллина.

#### **Литература**

1. Санарова Е.В. и др. Фотодинамическая терапия-способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей / Е.В. Санаров //Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13. №. 3. С. 109–118.
2. Капинус В. Н. и др. Применение хлорин Е6-фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи //Research'n Practical Medicine Journal. 2021. Т. 8. №. 4. С. 33–43.

**РОЛЬ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА TIM17:23 ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ В ПРОЦЕССЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ *ARABIDOPSIS THALIANA*\***К. Д. Елизова<sup>1,2</sup>, Т. А. Тарасенко<sup>2</sup><sup>1</sup>Иркутский государственный университет<sup>2</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

✉ elizova-k@mail.ru

**Аннотация**

Данная работа направлена на выявление участников механизма импорта ДНК в митохондрии. Исследование проводилось с использованием митохондрий, изолированных из растений *Arabidopsis thaliana* с мутацией по одному из ключевых компонентов транслоказы внутренней митохондриальной мембраны TIM17:23 — TIM17 и TIM23. Показано возможное участие этих мембранных белков в импорте субстратов ДНК разной длины.

Для реализации своих функций в клетке и нормальной жизнедеятельности митохондриям необходим импорт макромолекул. Подавляющее большинство генов митохондриального генома в процессе эволюции было перенесено в ядерный геном [1], а продукты этих генов импортируются в органеллу по мере необходимости. Импорт РНК необходим для регуляции экспрессии митохондриальных генов, в то время как импорт ДНК, предположительно, имеет эволюционное значение и вносит вклад в динамику генома этих органелл.

О механизме импорта ДНК в митохондрии — природной способности митохондрий к поглощению ДНК из окружающей среды — в настоящий момент известно недостаточно. Известно, что у растений этот процесс происходит при участии порина VDAC (от англ. *Voltage-Dependent Anion Channel*) во внешней и адениннуклеотидтранслоказы ANT (от англ. *Adenine Nucleotide Translocator*) во внутренней митохондриальных мембранах [2], и может осуществляться посредством нескольких альтернативных механизмов [3]. Не исключено, что множественный характер импорта ДНК в митохондрии растений обеспечивается, прежде всего, разнообразием белковых комплексов, входящих в состав внутренней митохондриальной мембраны. Примечательно, что для растительных митохондрий показано пересечение путей транслокации белков и тРНК [4; 5], и существуют косвенные доказательства пересечения импорта тРНК и ДНК [3]. Исходя из этих данных, логично предположить, что компоненты белковых комплексов, принимающие участие в транспорте ДНК в митохондрии, могут быть участниками аппарата, обеспечивающего транслокацию белков.

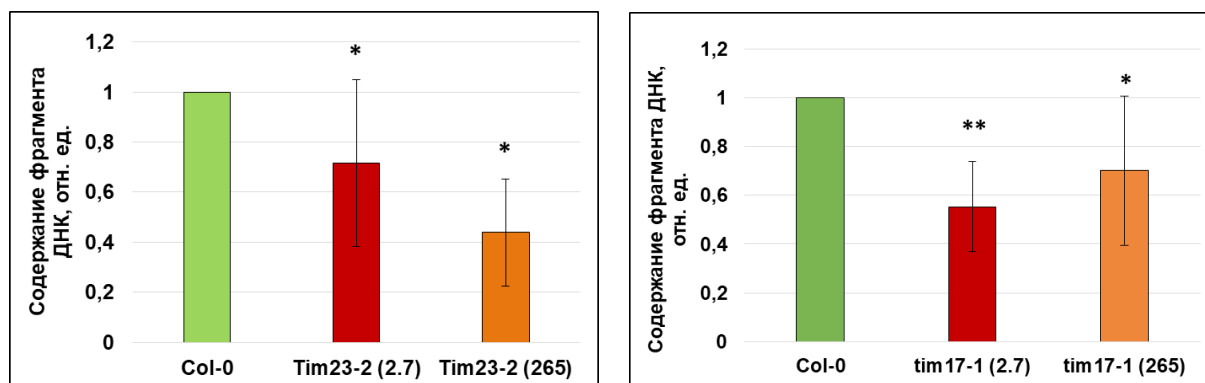
В процессе импорта белков в митохондриальный матрикс первостепенную роль играет TIM-комплекс (от англ. *Translocase of the Inner Membrane*), также называемый комплекс TIM17:23, в составе которого субъединица TIM23 ответственна за образование поры, а TIM17 — за стабилизацию и регуляцию этой поры [5]. Для каждого из этих компонентов характерно наличие трех изоформ, однако наше исследование было сфокусировано на мажорных изоформах TIM17-1 и TIM23-2, непосредственных участников процесса транспорта белков.

В рамках нашей работы был проведен импорт ДНК малой (265 п.н.) и средней (2,7 т.п.н.) длины в митохондрии из растений арабидопсиса, мутантных по исследуемым белкам (рис.). Как оказалось, при проведении исследования возможного участия TIM23-2 в импорте ДНК разной длины, уровень импорта как фрагмента 265 п.н., так и фрагмента 2,7 т.п.н. в митохондрии, мутантные по этому белку, был снижен по сравнению с линией дикого типа (рис., а). При этом более выраженное снижение эффективности этого процесса продемонстрировано в случае импорта малой длины (в 2,3 раза по сравнению с контролем в отличие от фрагмента средней длины, для которого снижение уровня импорта составило 1,4 раза).

В то же время, эффективность импорта ДНК этих же размерных классов в митохондрии, в мембране которых отсутствует белок TIM17-1, была снижена, причем, в противоположность результатам исследования белка TIM23-2, этот эффект был сильнее выражен для фрагмента средней (в 1,8 раз), чем для фрагмента малой длины (в 1,4 раза) (рис., б). Полученные данные указывают на то, что как TIM17-1, так и TIM23-2, очевидно, принимают участие в переносе ДНК разной длины, при этом каждый из этих белков обладает некоторой специализацией в отношении размера переносимой в митохондрии молекулы.

Таким образом, нами впервые продемонстрировано участие в процессе импорта ДНК, протекающего в растительных митохондриях, компонентов аппарата импорта белков TIM17:23. Полученные результаты могут быть полезны в разработке системы эффективной трансформации митохондриального генома.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-44-383003).



Анализ импорта ДНК размером 2,7 т.п.н. и 265 п.н. в изолированные митохондрии *A. thaliana* линий дикого типа (Col-0) и мутанта *a* — по белку TIM23-2 или *b* — TIM17-1 с использованием ПЦР в реальном времени. На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Уровень импорта в линии Col-0 принят за условную единицу.

Допуски на диаграммах обозначают стандартное отклонение; \* и \*\* — статистически значимые различия при  $P \leq 0,05$  и  $P \leq 0,001$  соответственно

### Литература

1. Johnston I.G. Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention / I. G. Johnston, B. P. Williams // Cell Systems. — 2016. — V. 2, N 2. — P. 101–111.
2. Koulintchenko M. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex / M. Koulintchenko, Y. Konstantinov, A. Dietrich // EMBO J. — 2003. — V. 22, N 6. — P. 1245–1254.
3. Weber-Lotfi F. Nucleic acid import into mitochondria: new insights into the translocation pathways / F. Weber-Lotfi, M. V. Koulintchenko, N. Ibrahim [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. — 2015. — V. 1853, N 12. — P. 3165–3181.
4. Campo M. L. Revisiting trends on mitochondrial mega-channels for the import of proteins and nucleic acids / M. L. Campo, P. M. Peixoto, S. Martinez-Caballero // J. Bioenerg. Biomembr. — 2017. — V. 49, N 1. — P. 75–99.
5. Verechshagina N.A. Import of proteins and nucleic acids into mitochondria / N.A. Verechshagina, Y.M. Konstantinov, P.A. Kamenski [et al.] // Biochemistry (Moscow). — 2018. — V. 83, N 6. — P. 643–661.

## КОНЦЕНТРАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ: СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И МЕТА-АНАЛИЗ ДАННЫХ\*

Е. А. Ермаков<sup>1,2</sup>, М. М. Меламуд<sup>1</sup>, Е. А. Балахонова<sup>1</sup>, Г. А. Степанов<sup>1</sup>, Г. А. Невинский<sup>1,2</sup>, В. Н. Бунева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ evgeny\_ermakov@mail.ru

### Аннотация

В работе проанализирован уровень внеклеточной ДНК в плазме крови больных шизофренией и здоровых доноров. Методом флуориметрической детекции и ПЦР показано, что уровень циркулирующей внеклеточной ДНК у пациентов в 1,4 раза выше, чем у здоровых доноров. Проведенный мета-анализ литературных данных подтвердил полученные результаты.

Внеклеточная ДНК (вкДНК) представляет собой фрагменты нуклеиновых кислот, высвобождаемые из клеток в кровотоке [1]. Увеличение концентрации циркулирующей вкДНК в биологических жидкостях наблюдается при физиологических или патологических состояниях и может использоваться для диагностических целей [2]. Однако данные об уровне вкДНК у пациентов с шизофренией противоречивы. Поэтому цель данной работы заключалась в анализе концентрации вкДНК в плазме крови больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами.

В исследовании использованы 40 образцов плазмы (20 — от здоровых доноров, 20 — от больных шизофренией (F20.0 и F20.6)). Группа пациентов сопоставима по полу и возрасту со здоровыми донорами. Для выделения вкДНК использовали набор D-blood-50 компании ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия). Концентрацию выделенной вкДНК определяли методом флуориметрической детекции с использованием набора Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit на флуориметре Qubit 4 (ThermoFisher Scientific, Германия), а также методом ПЦР с «горячим» стартом в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов. В качестве референсного гена использовали ген рибонуклеазы Р человека (RP). Амплификацию проводили с использованием автоматического анализатора Light Cycler 96 (Roche Life Science, Мюнхен, Германия).

Концентрация вкДНК в плазме крови больных шизофренией составила (медиана [Q1; Q3]): 263,1 [142,7; 360,9] нг/мл. В случае здоровых доноров медианная концентрация вкДНК составила: 184,0 [121,1; 230,3] нг/мл. Несмотря на то, что уровень вкДНК у здоровых доноров был в 1,4 раза меньше, чем у больных шизофренией, отличия оказались статистически не значимыми (критерий Манна – Уитни,  $p = 0.06$ ). Таким образом, обнаружена тенденция к увеличению уровня вкДНК в плазме крови больных шизофренией, по сравнению со здоровыми донорами. Анализ методом ПЦР показал аналогичные результаты.

Дополнительно впервые проведен мета-анализ литературных данных уровня вкДНК при шизофрении. Анализ проведен в соответствии с международными рекомендациями PRISMA 2020 [3]. Статистическую обработку результатов мета-анализа проводили с помощью программ Review Manager 5.4.1, MedCalc и OriginPro 2021. Модель случайного эффекта использовалась для оценки размеров эффекта. Для оценки эффекта рассчитывали стандартизованную разность средних (SMD). Степень неоднородности оценивали с помощью статистического теста  $I^2$ . Уровень систематической ошибки оценивали с помощью критерия Эггера, критерия Бегга и воронкообразных графиков.

Проведенный мета-анализ объединил данные восьми исследований с участием 946 пациентов и 541 здорового донора. Показано, что концентрация циркулирующей вкДНК при шизофрении достоверно выше, чем у здоровых доноров. SMD для общего эффекта составил 0,56 (95 % ДИ = [0,36–0,75]) с умеренной неоднородностью ( $\text{Chi}^2 = 9,32$ ,  $\text{df} = 7$  ( $P < 0,007$ );  $I^2 = 64,8\%$ , 95 % ДИ = [24,91–83,5]). Тест на общий эффект также подтвердил значимость различий ( $Z = 5,58$ ;  $P < 0,00001$ ). При использовании критерия Эггера ( $P = 0,2446$ ), критерия Бегга ( $P = 0,0833$ ) и воронкообразного графика не наблюдалось никаких доказательств предвзятости включенных исследований. Таким образом, мета-анализ подтвердил полученные данные об увеличении циркулирующей вкДНК при шизофрении.

### Литература

1. Aucamp J., Bronkhorst A. J., Badenhorst C. P., et al. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature // *Biological Reviews*. 2018. V. 93. № 3. P. 1649-1683.
2. Lo Y. M. D., Han D. S., Jiang P., et al. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies // *Science*. 2021. V. 372. № 6538. P. eaaw3616.
3. Page M. J., McKenzie J. E., Bossuyt P. M., et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews // *Systematic reviews*. 2021. V. 10. № 1. P. 1-11.

\* Работа поддержана грантом РФФ № 21-75-00102.

## АНАЛИЗ ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА ГРИБОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ХИТОЗАНОМ ИЗ *HERMETIA ILLUCENS*.

А. А. Ермолюк<sup>1,2</sup>, Д. А. Авданина<sup>2</sup>, А. Ш. Хайрова<sup>2</sup>, С. А. Лопатин<sup>2</sup>, А. А. Жгун<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр биотехнологии РАН, Москва

✉ anya\_ermolyuk@mail.ru

### Аннотация

Старинные произведения темперной живописи являются хорошим субстратом для роста микроорганизмов, поскольку раньше в качестве связующих для пигментов использовали богатые питательными веществами яичный желток и белок. В нашей работе изучили эффективность ингибирования грибов-деструкторов темперной живописи новым хитозаном, выделенным из *Hermetia illucens* (насекомое Чёрная львинка).

Число соединений, которое используют в качестве антисептиков для защиты живописных материалов, в последнее время ощутимо сократилось. Это произошло из-за отказа от применения ранее использовавшихся препаратов, оказавшихся высокотоксичными, поэтому остался довольно узкий круг используемых антисептиков, существенно сокращающий возможность эффективной борьбы против микроорганизмов-деструкторов живописных материалов, важнейшими из которых являются плесневые грибы. В этой связи одним из перспективных веществ видится экологически чистый хитозан, выделенный из краба. Известно, что хитозаны могут иметь разные свойства [3]: низкомолекулярный хитозан, выделенный из *H. illucens*, обладает сопоставимыми, а в ряде случаев лучшими антимикозными характеристиками по сравнению с крабовым хитозаном [1].

В связи с этим в нашей работе изучили противогрибковую активность низкомолекулярных хитозанов с молекулярной массой (ММ) 33, 36, 39, 53 и 88 кДа из *H. illucens* и 25 и 47 кДа из крабового хитина, полученных методом химического гидролиза. Для определения противогрибковой активности в качестве тест-культур использовали 12 штаммов плесневых грибов. Для положительного контроля использовали широко применяемый антисептик Катамин АБ. Эффективность ингибирования сравнивали по отношению радиального роста грибных колоний на агаризованной среде Чапека-Докса (ЧДА) с добавлением хитозанов к росту на контрольной среде (без добавок). Эксперимент позволил определить динамику ингибирования роста при добавлении того или иного хитозана и сравнить силу воздействия изучаемых антисептиков.

Оказалось, что активность хитозанов из *H. illucens* в целом возрастает в ряду от 33 до 88 кДа. Причем наибольшая активность соответствует хитозану с ММ 33 кДа, а наименьшая активность — с ММ 88 кДа. В этом ряду выпадает эффективность ингибирования хитозана с ММ 36 кДа, примерно соответствующая уровню ингибирования хитозана с ММ 88 кДа. Дабы разобраться в этом феномене определили второй важнейший параметр — степень дезацетилирования (СДА). Выяснилось, что у хитозана с ММ 36 кДа в результате химического гидролиза СДА была ниже, чем у остальных хитозанов, что могло послужить основным фактором, который привел к снижению антимикозных свойств. Наиболее эффективные хитозаны с ММ 33 и 39 кДа из *H. illucens* показали одинаковый результат ингибирования с хитозанами, полученными на основе крабового панциря. Ранее в эксперименте с «крабовыми» хитозанами показали, что в ряду 6-12-18-25-45 кДа на ЧДА наиболее активно подавляют рост хитозаны с ММ 25 и 45 кДа [2]. В нашем эксперименте проследили обратную тенденцию, в ряду от 33 до 88 кДа: эффективными оказались хитозаны с ММ 33 и 39 кДа.

Можно сделать вывод, что хитозан, полученный из *H. illucens*, может служить перспективным материалом для защиты живописи, поскольку демонстрирует близкие защитные свойства против грибов-деструкторов. Поскольку для различных грибных штаммов максимум ингибирования приходится на различные значения внутри ряда 6–88 кДа, при создании эффективного ингибитора широкого спектра действия наиболее действенным видится коктейль из различных хитозанов, одними из компонентов которого могут служить хитозаны из *H. illucens*, с ММ 33 и 39 кДа.

### Литература

- Zhgun A. et al. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. Public Library of Science (PLoS), 2020. Vol. 15, № 4. P. e0230591.
- Zhgun A.A. et al. Search for Efficient Chitosan-Based Fungicides to Protect the 15th–16th Centuries Tempera Painting in Exhibits from the State Tretyakov Gallery // Microbiol. (Russian Fed. 2020. Vol. 89, № 6. P. 750–755.
- Khayrova A. et al. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of Low Molecular Weight Chitosan Extracted from *Hermetia illucens* Relative to Crab Chitosan // Mol. 2022, Vol. 27, Page 577. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 27, № 2. P. 577.



## СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ SKQ1 НА ФОНЕ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Д. А. Жаглин

*Воронежский государственный университет*

✉ dimitrizhaglin@yandex.ru

### Аннотация

Проведено исследование содержания восстановленного глутатиона и активности ферментативного звена глутатионовой системы в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите (РА) и воздействии антиоксиданта SkQ1 на фоне развития патологии. Полученные результаты свидетельствуют о способности молекулы смещать показатели концентрации глутатиона и активности исследуемых ферментов в сторону контрольных значений в условиях развития РА.

### Введение

Ревматоидный артрит (РА) — системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани, характеризующееся преимущественным поражением периферических суставов. Имеющиеся литературные данные указывают на интенсификацию процессов свободнорадикального окисления в патогенезе РА [1], которая, в свою очередь, сопровождается истощением антиоксидантной системы [2].

Таким образом, представляется перспективным применение молекул, обладающих антиоксидантным эффектом, для лечения заболевания. В качестве такого соединения может выступать митохондриальный протектор SkQ1.

Глутатионовая система, будучи одним из важнейших звеньев естественной антиоксидантной защиты клетки, остро реагирует на возникающий оксидативный стресс, поэтому изменения в ее состоянии являются показательными для оценки развития патологии.

### Материалы и методы

В качестве экспериментальных объектов были использованы самцы белых лабораторных крыс с адьювантной моделью РА, развивающейся в течение 14 дней. Животные были разделены на три группы: контроль, крысы с РА без лечения и животные, получавшие соединение путем ежедневной внутривнутрибрюшинной инъекции с 7-го дня развития патологии в дозировке 1250 нмоль/кг массы тела.

В ходе работы в тканях животных спектрофотометрически была измерена активность ферментов глутатионового редокс-цикла: глутатионпероксидазы (GPX), глутатионредуктазы (GSR) и глутатионтрансферазы (GST), а также оценена концентрация восстановленного глутатиона (GSH). Данные анализировали с применением t-критерия Стьюдента.

### Результаты

Введение SkQ1 на фоне развития РА приводило к нормализации ферментативной активности GPX, представленной в Е/мг сырой массы ткани и Е/мл сыворотки крови. Данный показатель снизился в 1,3 раза в печени и в 1,2 раза в мышцах, сердце и сыворотке крови по сравнению с животными с патологией. Также наблюдалось сонаправленное изменение активности GSR, выраженной в Е/мг сырой массы ткани печени и в Е/мл сыворотки крови, в 1,3 раза. Снижение энзиматической активности данного фермента в мышцах и сердце было несущественным.

Концентрация GSH у группы животных, получавших лечение на фоне патологии, относительно группы с РА без лечения, возрасла: в печени — в 1,4 раза, в сердце — в 3,9 раза, в сыворотке крови — в 2,2 раза. Для мышц изменение данного показателя было малозначимым, что можно обосновать вызванным их расположением меньшей локальной концентрацией SkQ1 в ткани, а также невысокой метаболической активностью, еще более угнетенной близкорасположенным воспалительным процессом. Резкое повышение содержания GSH в сердце, по-видимому, прежде всего связано с его регенерацией из окисленной формы, накопившейся в избыточном количестве на фоне протекания процессов СО.

Вслед за повышением концентрации GSH отмечено увеличение ферментативной активности GST, представленной в Е/мг сырой массы ткани и Е/мл для сыворотки крови, которое составило: в печени — в 1,5 раза, в мышцах — в 1,4 раза, в сердце — в 1,7 раза, в сыворотке крови — в 1,8 раза.

**Заключение**

Таким образом, введение SkQ1 крысам с индуцированным РА способствовало смещению энзиматической активности GPX, GSR и GST в сторону значений, характерных для животных контрольной группы, а также повышению концентрации GSH, что, вероятно, связано со снижением функциональной нагрузки на глутатионовый редокс-цикл за счет антиоксидантной активности тестируемого соединения.

**Литература**

1. Fonseca L.J. S. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies / L.J. S. Fonseca, V. Nunes-Souza, M. O. Fonseca Goulart et al. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. V. 2019. P. 1–16.
2. Vijayakumar D. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of rheumatoid arthritis patients / D. Vijayakumar, K. Suresh, S. Manoharan // *Indian J. Clin. Biochem.* 2006. V. 21, №. 1. P. 104–108.

**ВЛИЯНИЕ ПРЕ-АНАЛИТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОФИЛИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОРНК ПЛАЗМЫ: СОВРЕМЕННОЕ ВИДЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ И СОБСТВЕННЫЙ ОПЫТ\***

А. В. Желанкин, Л. Н. Юльметова, Е. И. Шарова

*Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины ФМБА России, Москва*

✉ zhelankin.andrey@gmail.com

**Аннотация**

На профили циркулирующих микроРНК плазмы влияют различные пре-аналитические факторы. Используя секвенирование малых РНК, мы исследовали профили микроРНК плазмы при использовании различных типов антикоагулянтов в пробирках для забора крови.

Циркулирующие внеклеточные микроРНК плазмы (ц-микроРНК) в настоящее время рассматриваются как потенциальные биомаркеры различных физиологических и патологических состояний человека. Более тысячи опубликованных исследований посвящено выявлению изменений в профилях ц-микроРНК при раке, диабете и сердечно-сосудистых заболеваниях. Показано, что эти профили меняются при травмах, физических нагрузках, беременности, курении, приеме некоторых лекарственных препаратов, а также зависят от возраста и пола. Развитие направления изучения ц-микроРНК как биомаркеров привело к накоплению данных о влиянии пре-аналитических факторов на их профили в плазме. К этим факторам относятся выбор типа биоматериала (плазма или сыворотка), выбор типа антикоагулянта при заборе крови, параметры центрифугирования при получении внеклеточной фракции, хранение образцов биоматериала, и способ выделения РНК. Гемолиз — разрушение эритроцитов в процессе получения плазмы или сыворотки — оказывает существенное влияние на профили ц-микроРНК. Кроме того, условия получения плазмы влияют и на активацию тромбоцитов *in vitro*, что также может привести к смещению уровней ряда ц-микроРНК. Ряд современных методологических исследований влияния пре-аналитических факторов на ц-микроРНК приводит обоснования для выбора общепринятых методик, таких как двухэтапное центрифугирование или спектрофотометрический контроль гемолиза, которые являются ключевыми для возможности критической оценки результатов исследований и их стандартизации.

Используя эти рекомендации в совокупности с секвенированием малых РНК плазмы, мы оценили влияние одного из малоизученных факторов — выбора антикоагулянта при заборе крови — на полные профили ц-микроРНК десяти условно здоровых добровольцев от 25 до 40 лет. Было показано, что использование ЭДТА по сравнению с антикоагулянтами на основе цитрата (АСД, СТАД и цитрат натрия) приводит к повышению уровня гемолиза, что сказывается на соотношении микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения в плазме. Выявлено 50 микроРНК, имеющих значимые различия в экспрессии при сравнении групп образцов с разным типом антикоагулянта. Среди микроРНК, уровень которых в плазме был значимо повышен при использовании ЭДТА, большая часть принадлежит либо к микроРНК эритроцитарного происхождения (на основании данных секвенирования микроРНК эритроцитов), либо к микроРНК, ассоциированным с гемолизом (на основании данных о влиянии гемолиза на профили микроРНК). Обнаружено, что выбор антикоагулянта влияет на уровни ряда микроРНК, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Экспрессия ряда микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения была валидирована с помощью количественной ПЦР. Проведенное исследование вносит вклад как в выстраивание стратегий стандартизации пре-аналитических факторов для изучения ц-микроРНК при патологиях, так и в формирование представления о «нормальном» профиле ц-микроРНК плазмы.

\* Данное исследование поддержано грантом РФФ № 21-75-00114.

© А. В. Желанкин, Л. Н. Юльметова, Е. И. Шарова, 2022

## ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ГЛИОМ С ИНДУЦИРОВАННЫМИ МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ *IDH1* И *TP53*\*

В. М. Жменя, В. С. Гулая, А. О. Пенькова, В. В. Кумейко

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

✉ zhmenia.vm@vfu.ru

### Аннотация

Глиома является наиболее распространенной первичной опухолью головного мозга, при которой выживаемость составляет не менее года. Данное заболевание характеризуется быстрым развитием и частыми рецидивами, а специфическая терапия имеет низкую эффективность из-за высокой гетерогенности глиом. Темозоломид (ТМЗ) является химиотерапевтическим средством первого выбора при глиомах, однако развитие резистентности к ТМЗ ограничивает эффективность лечения.

Гистологические подтипы глиом хорошо коррелируют с наличием у пациента драйверных мутаций в генах изоцитратдегидрогеназы (*IDH*) и опухолевого белка p53 (*TP53*) [1]. Однако независимо от наличия или отсутствия мутаций в глиомах препаратом выбора для лечения глиом остается ТМЗ. Доказано, что эффективность лечения данным препаратом варьируется в зависимости от наличия мутаций в генах *IDH1* и *TP53*, которые могут влиять на химиорезистентность клеток глиом [2, 3]. До настоящего времени не выявлены все молекулярные мишени, на которые влияет ТМЗ при наличии той или иной мутации, из-за чего отсутствует персонализированный подход на основе мутационного профиля пациента.

**Целью исследования является** выявление возможных молекулярных мишеней, отвечающих за химиорезистентность к ТМЗ клеток глиом, несущих миссенс мутации в генах *IDH1* и *TP53*.

Материалом исследования являлись клеточные линии человеческой глиомы U87MG с индуцированными мутациями *IDH1* R132H и *TP53* R248Q, которые вводили с помощью цитидиновых дезаминаз с использованием подхода BIG TREE [4]. Жизнеспособность клеток под ТМЗ оценивали с помощью МТТ-теста, экспрессию генов клеточного цикла и гена репарации под влиянием ТМЗ измеряли при помощи количественной ПЦР.

### Результаты исследования

Выяснено, что мутация *IDH1* не оказывает значимого влияния на выживаемость клеток под действием ТМЗ (рис. 1). При этом гетерозиготная мутация *TP53* не приводит к значимым отличиям в выживаемости клеток, однако клетки *TP53het* и *IDH1het-TP53het* активируют нормальный *TP53* и останавливают клеточный цикл, а также активно синтезируют MGMT для защиты от ТМЗ (рис. 2). *TP53* в гомозиготном варианте приводит к значимо более высокому выживанию клеток глиом под действием ТМЗ, однако молекулярный механизм данной резистентности неизвестен (см. рис. 2). В данной работе мы показали, что мутантный *TP53* R248Q не активирует ни синтез генов нормального *TP53* пути, ни гены клеточного цикла, ни систему репарации MGMT (см. рис. 2).

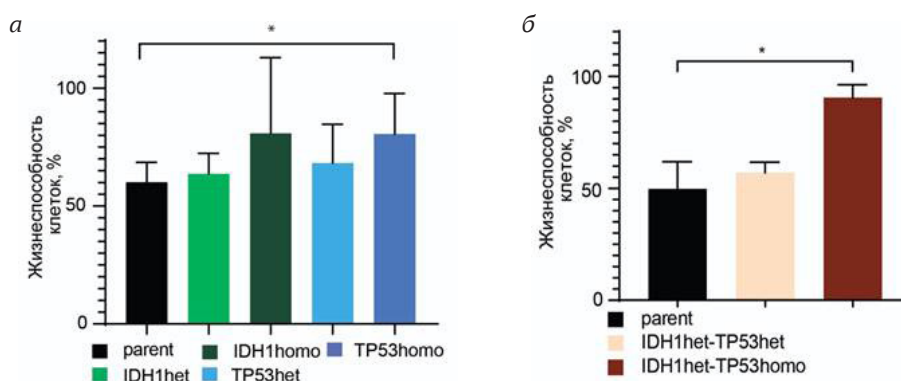
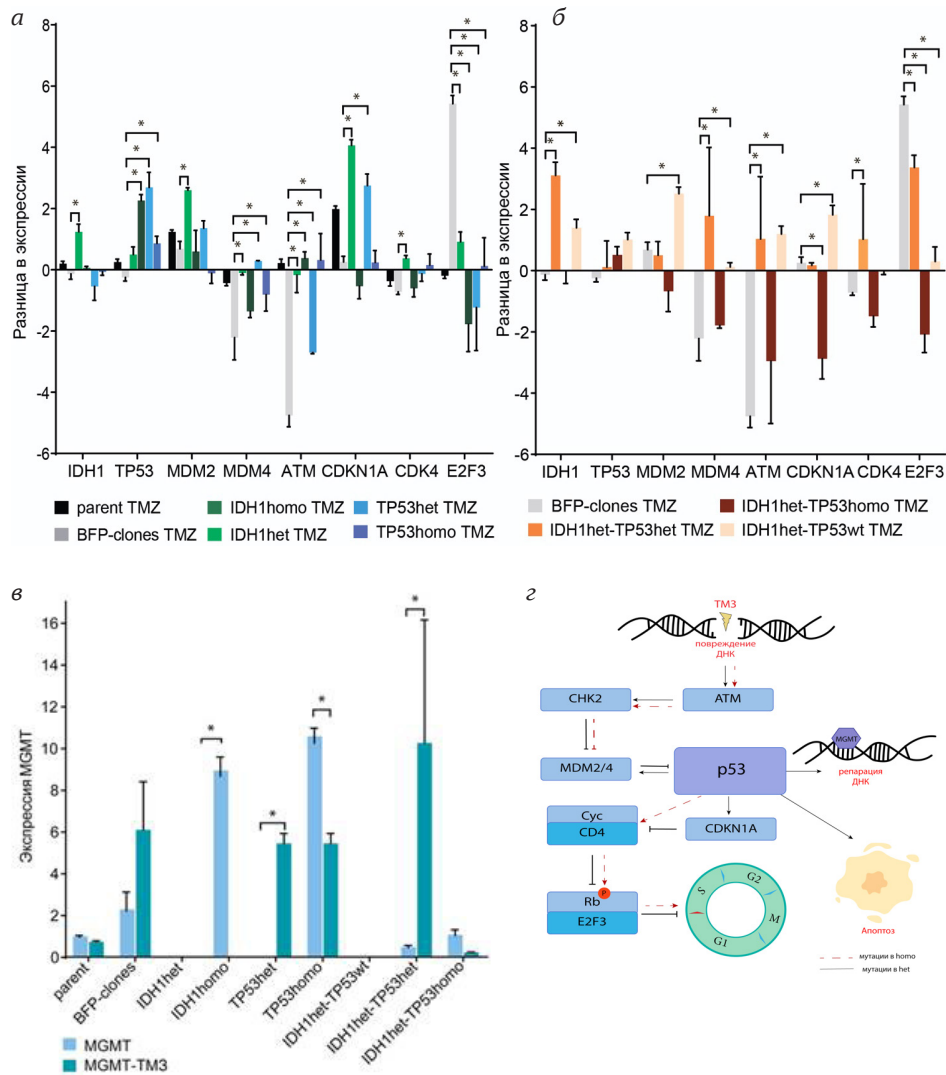


Рис. 1. Цитотоксический эффект на клеточные линии глиом под действием ТМЗ: а — влияние ТМЗ на жизнеспособность одномутантных клеточных линий с мутациями в генах *IDH1* или *TP53*, через 48 часов инкубации; б — влияние ТМЗ на жизнеспособность двумутантных клеточных линий глиом, через 48 часов инкубации. Значения представлены для  $n = 3$  повторов в виде среднего  $\pm$  ошибки среднего

\* Исследование финансировалось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0657-2020-0004 и гранта РФФИ № 20-15-00378.

Механизм действия TP53 R248Q еще только предстоит выяснить.

Рис. 2. Экспрессия генов под влиянием TMZ: а — экспрессия генов клеточного цикла под влиянием



TMZ в одномутантных линиях; б — экспрессия генов остановки клеточного цикла под влиянием TMZ в двумутантных линиях. Значения представлены в виде логарифма по основанию два взятого от кратности изменения экспрессии гена по сравнению с parent. Результаты представлены для n=6 повторов в виде среднего ± ошибки среднего; в — экспрессия гена репарации *MGMT* под влиянием TMZ. Результаты выражены в значениях относительной нормализованной экспрессии и представлены для n = 3 повторов в виде среднего ± ошибки среднего; г — схема влияния TMZ на молекулярный путь TP53

**Литература**

1. Louis D.N. et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. // *Neuro Oncol.* 2021. Vol. 23, № 8. P. 1231–1251.
2. Millward C.P. et al. The impact of MGMT methylation and IDH-1 mutation on long-term outcome for glioblastoma treated with chemoradiotherapy. // *Acta Neurochir (Wien).* 2016. Vol. 158, № 10. P. 1943–1953.
3. Noor H. et al. TP53 mutation is a prognostic factor in lower grade glioma and may influence chemotherapy efficacy. // *Cancers (Basel).* 2021. Vol. 13, № 21.
4. Brookhouser N. et al. BIG-TREE: Base-Edited Isogenic hPSC Line Generation Using a Transient Reporter for Editing Enrichment. // *Stem Cell Reports.* 2020. Vol. 14, № 2. P. 184–191.

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF ALOX15**

A. M. Zhuravlev, A. B. Golovanov, R. R. Shafiullina, V. V. Aksenov, I. V. Ivanov

*Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «MIREA — Russian Technological University»,  
Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow*

✉ alekszhur95@yandex.ru

**Abstract**

ALOX15 is one of the six functional human LOX isoforms. Recent studies indicate the presence of an allosteric mechanism of enzyme regulation, which opens up new opportunities in the field of enzyme research. Selective effectors of ALOX15 can contribute to new approaches for the treatment of numerous human diseases with health political relevance.

First mammalian LOX was isolated in 1974. Representatives of this group of enzymes have a single binding center for the substrate. Significant kinetic studies, as well as site-directed mutagenesis study on rabbit ALOX15 and human ALOX5 and ALOX15B isoforms have confirmed this assumption. Moreover, these studies made significant contribution to understand how mechanisms of enzymatic reactions in which LOX are involved workup. In recent years, the phenomenon of allosteric regulation of LOX functionality was discovered. The possibility of allosteric regulation of the enzymatic activity of human ALOX15 and ALOX15B was demonstrated by the oxidation products of AA and LA: 15 (S)-HETE and 13(S)-HODE, respectively, and for a number of heterocyclic compounds, the presence of which can increase the affinity of the enzyme to one substrate, while reducing its affinity to another [1].

Later, the dynamic aspects in the LOX functionality model were considered. It was found that the ALOX15 complex has a dimeric crystal structure consisting of two completely different conformers, which in turn are connected to each other by two helices 2 and 18. In this case, one of the monomers has the inhibitor molecule located at the substrate-binding cavity; and the other monomer does not have any ligand. Considering allosteric regulation of ALOX15 catalytic activity a significant role can be played by the conformational mobility of the structure of its conformers, which in the presence of a ligand may force transient dimeric complexes formation via intermolecular interaction of both ALOX15 conformers. Moreover, when one conformer of the enzyme binds fatty acid substrate, being as a catalytic subunit the other ALOX15 conformer is allosteric subunit. The polyunsaturated fatty acids substrates and the allosteric effector bind to the substrate-binding cavities of two different conformers in the dimeric ALOX15 molecule. The spatial location of the allosteric monomer determines the intermolecular coordination of the conformer molecules and, consequently, the activity of the entire enzyme [2]. To study the structure-function relationship of ALOX15, we developed a series of inhibitors based on N-(3-(R-2-yl)phenyl)sulfamoyl)carbamates modified by various anchor groups (R = 1H-indol-; 1H-benzo[d]imidazol-; benzo[d]oxazol-). The resulting compounds will be used to study SAR of ALOX15.

**References**

1. Offenbacher A.R., Holman T.R. Fatty acid allosteric regulation of C-H activation in plant and animal lipoxygenases // *Molecules*. MDPI AG, 2020. Vol. 25, № 15.
2. Sultan M. et al. Specific overexpression of 15-lipoxygenase in endothelial cells promotes cancer cell death in an in vivo Lewis lung carcinoma mouse model // *Adv. Med. Sci. Medical University of Bialystok*, 2020. Vol. 65, № 1. P. 111–119.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ COVID-19 И БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА\***

Ю. А. Загрядская, И. О. Охрименко

*Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний  
Московского физико-технического института (МФТИ), Долгопрудный*

✉ ivan.okhrimenko@phystech.edu

**Аннотация**

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространённой формой деменции и одним из социально значимых возрастных заболеваний. При этом возможен дополнительный рост заболеваемости, вызванный пандемией SARS-CoV-2, так как COVID-19 и болезнь Альцгеймера имеют общие связи в отношении многих молекул, например ACE2, APOE, p53 и провоспалительных маркеров, таких как IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ .

В настоящее время болезнь Альцгеймера поразила более 50 миллионов человек во всем мире и является пятой по распространённости причиной смерти людей старше 65 лет в развитых странах. Ожидается, что к 2050 г. это число утроится, если не будет достигнут значительный прогресс в исследованиях в области ранней диагностики и новых эффективных методов лечения [1, 2]. В России число людей, страдающих болезнью Альцгеймера, оценивается более чем в 1 миллион человек, большинство пациентов составляют женщины (80 %), около 85 % пациентов были в возрасте 70-89 лет. До пандемии SARS-CoV-2 прогнозировалось значительное увеличение числа случаев болезни Альцгеймера до 1,3 миллиона человек к 2020 г. только за счёт увеличения среднего возраста граждан России [3, 4]. Однако COVID-19, осложнения, стресс, могут привести к дополнительному увеличению случаев нейродегенерации. Анализ данных и исследования проведённые после начала пандемии показывают влияние этого вирусного заболевания на риск нейродегенерации из-за общих молекулярных и иммунных механизмов [5, 6].

Известно, что пожилые люди тяжелее переносят заражение SARS-CoV-2 [7]. Пациенты с возрастным заболеванием Альцгеймера с повышенной вероятностью могут иметь не типичные симптомы и течение COVID-19 [8,9]. Они также имеют повышенный риск госпитализации при COVID-19 (и, в частности, риск ОРДС) и неблагоприятных исходов в соответствии с многочисленными исследованиями [10,11]. Анализ спинномозговой жидкости у больных COVID-19 выявил значительные увеличенные концентрации провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-8, IL-10, IP-10 и TNF- $\alpha$  [12,5]. Концентрация последнего значительно повышена в течение 6 месяцев после тяжело перенесённого COVID-19, это наблюдается и при когнитивных нарушениях при нейродегенерации [13]. Повышенная концентрация другого ключевого маркера воспаления при COVID-19 — IL-6 также наблюдается и при нейродегенерации [14, 15].

Экспрессия гена кодирующего транскрипционный фактор и регулятор клеточного цикла p53 снижена в крови пациентов с COVID-19, и это сохраняется по крайней мере в течение 24 недель после заражения у пациентов с длительным течением COVID-19. Важно, что длительное снижение p53-ассоциированной функции подавления опухоли может представлять собой фактор риска онкогенеза [16]. При этом, уровень p53 зависит от возраста [17], p53 является неотъемлемой частью системы врождённого и клеточного иммунитета [18, 19], p53 регулирует синтез компонент комплекса  $\gamma$ -секретазы, осуществляющего финальный акт гидролиза белка предшественника  $\beta$ -амилоида (APP) с образованием различных форм A $\beta$  и пептидинового фрагмента AICD [20], регулирующего в свою очередь активность p53 на транскрипционном уровне [21, 22].

Детальное понимание общих молекулярных механизмов COVID-19 и болезни Альцгеймера позволит предотвратить риск увеличения её случаев в будущем, т.к. выявление практически важных взаимосвязей позволит улучшить раннюю диагностику и, мы надеемся, что созданные на основе новой информации терапевтические подходы снизят социальную и экономическую нагрузку, возлагаемую на родственников пациентов и систему здравоохранения.

**Литература**

1. Alzheimer's Disease International. World Alzheimer report 2019: attitudes to dementia //Alzheimer's Disease International: London. — 2019.
2. Alzheimer's Association et al. 2018 Alzheimer's disease facts and figures //Alzheimer's & Dementia. — 2018. — Т. 14. — №. 3. — С. 367-429.
3. Белоусов Ю. Б. и др. Клинико-экономические аспекты терапии болезни Альцгеймера в России //Качественная клиническая практика. — 2009. — №. Спецвыпуск. — С. 3-28.

\* Исследование поддержано Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проект № 20-015-00526).  
© Ю. А. Загрядская, И. О. Охрименко, 2022

4. Ваголина М. А., Самородская И. В., Бойцов С. А. Потерянные годы жизни и смертность в результате болезни Альцгеймера в России //Психиатрия. — 2014. — №. 1. — С. 49-53.
5. McAlpine L. S., Fesharaki-Zadeh A., Spudich S. Coronavirus disease 2019 and neurodegenerative disease: what will the future bring? //Current opinion in psychiatry. — 2021. — Т. 34. — №. 2. — С. 177.
6. Abate G., Memo M., Uberti D. Impact of COVID-19 on Alzheimer's disease risk: viewpoint for research action // Healthcare. — MDPI, 2020. — Т. 8. — №. 3. — С. 286.
7. Bonafè M. et al. Inflamm-aging: Why older men are the most susceptible to SARS-CoV-2 complicated outcomes //Cytokine & Growth Factor Reviews. — 2020. — Т. 53. — С. 33-37.
8. Isaia G. et al. Atypical presentation of Covid-19 in an older adult with severe Alzheimer disease //The American Journal of Geriatric Psychiatry. — 2020. — Т. 28. — №. 7. — С. 790-791.
9. Bianchetti A. et al. Clinical presentation of COVID19 in dementia patients //The journal of nutrition, health & aging. — 2020. — Т. 24. — №. 6. — С. 560-562.
10. Hwang J. et al. Neurological diseases as mortality predictive factors for patients with COVID-19: a retrospective cohort study //Neurological sciences. — 2020. — Т. 41. — №. 9. — С. 2317-2324.
11. Reyes-Bueno J. A. et al. Case fatality of COVID-19 in patients with neurodegenerative dementia //Neurología (English Edition). — 2020. — Т. 35. — №. 9. — С. 639-645.
12. Benameur K. et al. Encephalopathy and encephalitis associated with cerebrospinal fluid cytokine alterations and coronavirus disease, Atlanta, Georgia, USA, 2020 //Emerging infectious diseases. — 2020. — Т. 26. — №. 9. — С. 2016.
13. Holmes C. et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease //Neurology. — 2009. — Т. 73. — №. 10. — С. 768-774
14. Lindlau A. et al. Predictors of hippocampal atrophy in critically ill patients //European Journal of Neurology. — 2015. — Т. 22. — №. 2. — С. 410-415.
15. Christensen A., Pike C. J. Menopause, obesity and inflammation: interactive risk factors for Alzheimer's disease //Frontiers in aging neuroscience. — 2015. — Т. 7. — С. 130
16. Gómez-Carballa A., Martínón-Torres F., Salas A. Is SARS-CoV-2 an oncogenic virus? //Journal of Infection. — 2022.
17. Lanni C. et al. Conformationally altered p53: a novel Alzheimer's disease marker? //Molecular psychiatry. — 2008. — Т. 13. — №. 6. — С. 641-647
18. Atretkhany K. S. N. et al. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment // Pharmacology & therapeutics. — 2016. — Т. 168. — С. 98-112.
19. Gudkov A. V., Komarova E. A. p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. — 2016. — Т. 6. — №. 11. — С. a026161.
20. Urban A. S. et al. Structural Studies Providing Insights into Production and Conformational Behavior of Amyloid- $\beta$  Peptide Associated with Alzheimer's Disease Development //Molecules. — 2021. — Т. 26. — №. 10. — С. 2897.
21. Checler F., Alves da Costa C. Parkin as a Molecular Bridge Linking Alzheimer's and Parkinson's Diseases? // Biomolecules. — 2022. — Т. 12. — №. 4. — С. 559.
22. Da Costa C. A. et al. The C-terminal fragment of presenilin 2 triggers p53-mediated staurosporine-induced apoptosis, a function independent of the presenilinase-derived N-terminal counterpart //Journal of Biological Chemistry. — 2003. — Т. 278. — №. 14. — С. 12064-12069.



## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА EGFR В ДНК ПЛАЗМЫ ПАЦИЕНТОВ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЁГКОГО МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

А. Д. Захаркина<sup>1</sup>, П. А. Гервас<sup>2</sup>, Н. В. Чердынцева<sup>2</sup>,  
А. Д. Ахмедов<sup>3</sup>, В. В. Козлов<sup>3</sup>, С. П. Коваленко<sup>1</sup>, В. А. Шаманин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «БиоЛинк», Новосибирск

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт онкологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

<sup>3</sup>Новосибирский областной клинический онкологический диспансер

✉ arina.zaharkina@mail.com

### Аннотация

Анализ циркулирующей опухолевой ДНК плазмы (цоДНК) продемонстрировал клиническую значимость в качестве альтернативного или дополнительного инструмента для определения мутаций гена EGFR у пациентов при немелкоклеточном раке лёгкого (НМРЛ). Для решения проблемы низкой концентрации цоДНК в образце плазмы предложено проведение мультиплексной таргетной амплификации фрагментов гена EGFR с обогащением по мутантному аллелю.

Новым этапом в лечении немелкоклеточного рака лёгкого стало создание таргетных препаратов — ингибиторов тирозинкиназы EGFR. Чувствительность опухоли к данной терапии коррелирует с наличием активирующих соматических мутаций гена EGFR. Жидкостная биопсия позволяет тестировать мутации в плазме крови пациентов с НМРЛ, содержащей вкДНК, в которой присутствует цоДНК. К ограничениям данного подхода относятся низкая концентрация вкДНК в плазме крови и малая доля цоДНК от общего количества вкДНК плазмы, высвобождаемой нормальными клетками.

Целью работы является разработка метода для определения клинически значимых мутаций гена EGFR в ДНК плазмы пациентов при немелкоклеточном раке лёгкого методом ПЦР в режиме реального времени. При проведении мультиплексной таргетной амплификации увеличение содержания мутантного аллеля в образце происходит за счёт подавления амплификации ДНК дикого типа (ПАДТ ПЦР). ПАДТ достигается посредством добавления в ПЦР неудлиняемых олигонуклеотидов, комплементарных ДНК без мутации. Детекцию мутаций в ДНК продуктах после таргетной амплификации предлагается проводить с помощью аллель-специфичной ПЦР в реальном времени (асПЦР) с использованием флуоресцентных TaqMan-зондов.

Объектом исследования являлись: 1) модельные образцы нормальной ДНК плаценты человека с добавлением ДНК плазмид с участками гена EGFR с мутациями 19del, T790M, L858R; 2) образцы плазмы крови здоровых добровольцев; 3) образцы плазмы крови, полученные от пациентов с НМРЛ. Для приготовления плазмы образцы цельной крови собирали в вакуумированные пробирки Roche для выделения вкДНК, кровь центрифугировали 10 минут при 1500g и отбирали плазму. Плазму замораживали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до выделения вкДНК. Выделение вкДНК проводили из 5 мл плазмы с помощью набора для выделения ДНК плазмы крови (ООО «БиоЛинк», Новосибирск, Россия). Мультиплексную ПАДТ ПЦР 19-21 экзонов гена EGFR проводили в объеме 50 мкл на амплификаторе BIS (ООО «НовосибБиоПрибор», Новосибирск, Россия). Амплификаты после ПАДТ ПЦР разводили в воде и использовали в асПЦР на мутации EGFR 19del, T790M, L858R. Определение мутаций методом асПЦР в реальном времени проводилось на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США) с помощью набора реагентов ООО «БиоЛинк».

В ходе работы установлено, что аналитическая чувствительность метода на модельных образцах ДНК с добавленной ДНК с мутацией составляет 1 % мутантного аллеля (mutant allele frequency, MAF). На модельных образцах ДНК проведена оценка эффективности наработки ампликонов в мультиплексной ПЦР и степени обогащения ампликонов с целевыми мутациями на фоне ДНК дикого типа. В настоящее время проводится работа по определению предела детектирования и специфичности метода на модельных образцах плазмы крови здоровых добровольцев с добавленной ДНК с мутациями гена EGFR. В дальнейшем планируется работа по определению клинической чувствительности и специфичности метода на образцах плазмы крови пациентов с НМРЛ.

Предлагаемый метод может быть применим для малоинвазивного мониторинга мутаций гена EGFR при НМРЛ. Разрабатываемая тест-система на основе ПЦР в реальном времени обладает преимуществами перед такими подходами, как капельная цифровая ПЦР (ddPCR) и секвенирование нового поколения (NGS), поскольку имеет простой рабочий процесс, обеспечивает быстрое получение результата, не требует дорогостоящего оборудования.

## ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\*

Е. А. Здерева, М. М. Цыганов, М. К. Ибрагимова

Научно-исследовательский институт онкологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

✉ zdereva.e@gmail.com

### Аннотация

С целью установления устойчивости и чувствительности к конкретным химиотерапевтическим препаратам, для персонализации лечения онкологических больных возможно определение маркеров химиочувствительности. Экспрессия некоторых генов в опухолевые ткани связана с химиорезистентностью и прогнозом у больных раком молочной железы (РМЖ). Интерес представляют исследования хромосомных aberrаций в локусах данных генов, влияющие на уровень экспрессии генов.

### Цель

Провести анализ связи экспрессии генов химиочувствительности *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* с эффектом неoadъювантной химиотерапии (НХТ).

### Материал и методы

В исследование включено 97 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ люминального В подтипа и клинической стадией IIA–IIIB, получавшие в 2006–2020 гг. лечение в клиниках НИИ онкологии (г. Томск, Россия). Для анализа aberrаций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности CytoScan™ HD Array фирмы Affymetrix (USA). Для биоинформатического анализа использовалась программа «Chromosome Analysis Suite 4.0». Уровень экспрессии оценивали при помощи ОТ-ПЦР. Анализ выживаемости проводили по методу Каплана–Мейера.

### Результаты

Установлено, что у больных с наличием объективного ответа на лечение (полная и частичная регрессия) экспрессия *RRM1* статистически выше, по сравнению с пациентами со стабилизацией и прогрессированием ( $p = 0,04$ ). Кроме того, высокие уровни экспрессии генов *TOP2a* и *TYMS* связаны с наличием объективного ответа на лечение ( $p = 0,03$ ). Аналогичный результат показан для гена *TUBB3* у пациентов, пролеченных таксотером в монорежиме. Наличие в биопсии опухоли высокого уровня экспрессии гена *GSTP1* сопряжено с низкой эффективностью НХТ по схеме CP ( $p = 0,05$ ).

Анализ связи наличия хромосомных aberrаций в исследуемых генах химиочувствительности у пациентов с РМЖ показал, что CNA слабо коррелирует с эффектом НХТ. Показано, что пациенты с гиперэкспрессией гена *GSTP1* имеют 100 % безметастатическую выживаемость (log-rank test  $p = 0,02$ ). На уровне выраженной тенденции было показано, что у пациентов с наличием делеции гена *RRM1* наблюдаются лучшие показатели выживаемости по сравнению с нормальной копийностью данного гена и амплификацией. Наличие амплификации гена *GSTP1* обуславливает высокую выживаемость (5-летняя БМВ 86 %), тогда как при делеции данный показатель превышает чуть более 50 %.

### Выводы

Не смотря на весьма противоречивые результаты о предиктивной и прогностической роли экспрессии и aberrаций числа копий исследуемых генов химиочувствительности, можно сказать, что в будущем оценка данных параметров будет полезна с точки зрения персонализированного подхода к выбору химиотерапевтических препаратов.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 22-25-00499.  
© Е. А. Здерева, М. М. Цыганов, М. К. Ибрагимова, 2022

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

А. Д. Зенина, Т. А. Григорьева

НИЛ «Молекулярная фармакология» СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург

✉ asyazen@mail.ru

### Аннотация

Разработан метод оценки, позволяющий идентифицировать потенциальные противоопухолевые агенты, подавляющие эффлюкс.

В настоящее время резистентность клеток опухолей является серьезной проблемой при лечении раковых заболеваний. Существует несколько механизмов формирования устойчивости клеток к применяемым цитотоксическим соединениям. Основным из них является эффлюкс веществ за счет функционирования АТФ-зависимых транспортных белков. К ним относятся Р-гликопротеин, белок устойчивости рака молочной железы (BCRP) и белок, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью (MRP).

Р-гликопротеин массой 170 кДа, кодируемый геном *ABCB1* (MDR1), может выбрасывать из клетки небольшие (300–4000 Да) липофильные, нейтральные или положительно заряженные молекулы, зачастую содержащие в своей структуре ароматические кольца. Белок BCRP массой 72 кДа, кодируемый геном *ABCG2*, переносит широкий спектр соединений: от гидрофобных субстратов до гидрофильных органических анионов, а также нуклеозиды и их монофосфатные производные. Белок MRP массой 190 кДа кодируется геном *ABCC1*. Его субстратами являются органические анионы, конъюгированные с большой гидрофобной группой.

Современные исследования противораковых соединений направлены на поиск ингибиторов транспортных белков. В данной работе предложен метод оценки влияния веществ на эффлюкс, основанный на качественной и количественной оценке при помощи проточной цитометрии накопления в клетках флуоресцентных красителей Rhodamine 123 и Hoechst 33342, которые являются субстратами АТФ-зависимых транспортных белков.

Для работы был использован штамм клеточной линии HCT116 (аденокарцинома толстой кишки человека), трансфицированный геном одного из АТФ-зависимых транспортных белков — BCRP (breast cancer resistance protein).

Сравнение интенсивности флуоресценции клеток проводилось на клеточном сортере SE3 (BioRad). В качестве контрольных образцов использовались клетки, не обработанные предполагаемыми ингибиторами транспортных белков, а также клетки, обработанные ортованадатом натрия — известным ингибитором АТФ-зависимых транспортеров. Смещение максимума интенсивности флуоресценции клеток в присутствии изучаемых соединений позволило проводить сравнительную оценку эффективности потенциальных ингибиторов.

Предложенный подход будет использован для изучения свойств химиорезистентных клеточных линий и идентификации ингибиторов эффлюкса, обладающих противоопухолевым потенциалом.

## ПРОИЗВОДНОЕ ДИЗАМЕЩЕННОГО ПИПЕРАЗИНА СТАБИЛЬНО В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ВОССТАНАВЛИВАЕТ УТРАТУ СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ\*

Н. И. Зернов<sup>1</sup>, Д. М. Мелентьева<sup>1</sup>, Л. С. Унанян<sup>2</sup>, Е. А. Попугаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет

Петра Великого, лаборатория молекулярной нейродегенерации

<sup>2</sup> Российско-армянский университет, Институт биомедицины и фармации,  
лаборатория структурной биоинформатики, Ереван, Армения

✉ quakenbush97@gmail.com

### Аннотация

Выявлено новое соединение на основе пиперазина, которое может быть рассмотрено как потенциальный фармакологический агент для лечения болезни Альцгеймера. Соединение устраняет потерю грибовидных шипиков при воздействии на нейроны  $\beta$ -амилоидом, восстанавливать дефицит долговременной потенциации у восьмимесячных 5FAD мышей, стабильно в плазме мышей и человека.

Болезнь Альцгеймера (БА) — это нейродегенеративное заболевание, отличительной чертой которого является прогрессирующая потеря памяти. Потеря синаптических контактов и гибель нейронов, наблюдающаяся при БА, наиболее сильно затрагивает области коры головного мозга и гиппокампа, в конечном счете, приводя к их атрофии.

Обнаружено, что при БА в гиппокампальных нейронах из-за переизбытка кальция снижается активность нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК). нДУВК — сигнальный путь, направленный на закачку кальция из межклеточного пространства внутрь клетки.

Нами было обнаружено производное пиперазина 51164, которое является положительный модулятором TRPC6 канала, участвующего в нДУВК. 51164 было предложено в качестве потенциального соединения для лечения БА [1]. Также было показано, что воздействие на нейроны гиппокампа соединением 51164 способно стабилизировать морфологию дендритных шипиков, которые лежат в основе синаптических контактов, и восстановить синаптическую пластичность в срезах мозга мышей линии 5xFAD [1]. Однако соединение не демонстрировало удовлетворительных фармакокинетических свойств: стабильности в плазме крови и проницаемости через ГЭБ.

Ранее биоинформатическими методами были определены сайты и типы взаимодействия 51164 и гиперфорина с активным центром канала TRPC6 [2]. На основании полученных *in silico* данных был обнаружено соединение Z12\_30, которое аналогичным образом образует стабильное связь с активным центром TRPC6 и соответствует критериям «подобия лекарства».

Для структуры Z12\_30 выполнено *in vitro* исследование синаптопротекторных свойств в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной токсичности. Обнаружено, что Z12\_30 демонстрирует синаптопротекторные свойства в концентрациях 1 мкМ, 100 и 10 нМ.

Исследование влияния соединения Z12\_30 на индукцию и выработку долговременной потенциации (LTP) выполнено на срезах мозга мышей дикого типа и 5xFAD в возрасте 8 месяцев. LTP стимулировали по протоколу высокочастотной стимуляции (HFS). Показано, что у 5xFAD в возрасте 8 месяцев спустя 40 мин после HFS LTP не вырабатывается. Обработка срезов 5xFAD мышей 100нМ Z12\_30 восстанавливает выработку LTP спустя 40 мин после HFS до уровня близкого к дикому типу. Полученные предварительные результаты указывают на то, что Z12\_30 проявляет нейропротекторные свойства *ex vivo*, восстанавливая синаптическую пластичность в срезах мозга мышей 5xFAD.

Проведено *in vitro* исследование стабильности вещества Z12\_30 в плазме крови мышей и человека. Установлено, что при температуре 37 °С через 4 ч в плазме крови мышей остается около 91,5 % от начального количества вещества, в плазме крови человека — 99,8 %. Таким образом, можно сделать вывод, что вещество Z12\_30 стабильно в плазме крови мышей и человека.

При успешном прохождении доклинических исследований *in vivo* (стабильность в плазме крови, проницаемость через ГЭБ, острая токсичность) Z12\_30 будет исследовано в поведенческих тестах.

\* Данное научное исследование было проведено в рамках грантовой программы поддержки лучших проектов иностранных аспирантов «BIG PhD» в Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого и при поддержке гранта РФФИ № 20-75-10026.

**Литература**

1. E. Popugaeva *et al.*, “Derivatives of Piperazines as Potential Therapeutic Agents for Alzheimers Disease,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 95, no. 4, pp. 337—348, 2019, doi: 10.1124/mol.118.114348.
2. L. Hunanyan *et al.*, “Computer-Based Drug Design of Positive Modulators of Store-Operated Calcium Channels to Prevent Synaptic Dysfunction in Alzheimer’s Disease,” *Int. J. Mol. Sci. 2021, Vol. 22, Page 13618*, vol. 22, no. 24, p. 13618, Dec. 2021, doi: 10.3390/IJMS222413618.

## ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ РНК В КЛЕТКАХ HEK293 ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ДНРНК GAS5 ЧЕЛОВЕКА\*

Н. Д. Зинченко, Ю. И. Савиновская, М. С. Ермаков, А. А. Нуштаева, Е. В. Кулигина, Д. В. Семенов

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

✉ nikita.zinchenko.1994@mail.ru

### Аннотация

Длинные некодирующие РНК являются транскриптами длиной более 200 нуклеотидов, процессируемыми РНК-полимеразой 2 и не кодирующими белок. Длинные некодирующие РНК (днРНК) выполняют функции модулятора экспрессии генов. ДнРНК вовлечены в процессы репликации, транскрипции, трансляции, онкогенез и апоптоз.

Ген GAS5 (growth arrest specific 5) человека является хост-геном 10 малых ядрышковых С/D-боксов РНК, экзоны которого кодируют днРНК GAS5. Для днРНК GAS5 установлена антионкогенная и проапоптотическая функции. Уровень днРНК GAS5 понижен в онкотрансформированных клетках человека. Повышение уровня днРНК GAS5 в раковых клетках приводит к снижению пролиферации и жизнеспособности клеток и активирует проапоптотические процессы. ДнРНК GAS5 является перспективным объектом для поиска новых стратегий диагностики и терапии онкозаболеваний.

Целью данной работы является анализ функций днРНК GAS5 в клетках человека HEK293T в условиях эктопической экспрессии изоформ этой днРНК. Для этого нами созданы ДНК-конструкции, кодирующие изоформы днРНК GAS5. Фибробласты почек эмбриона человека HEK293T трансфицировали полученными ДНК-конструкциями. Проводили полнотранскриптомный анализ полученных трансфектантов на платформе Illumina 1500.

Была установлена группа мРНК, уровень которых модулируется эктопической экспрессией днРНК GAS5. Установлено, что экспрессия этих мРНК контролируется транскрипционными факторами SUZ12 и EZH2. Факторы SUZ12 и EZH2 являются ключевыми компонентами поликомб-PRC2 комплекса, эпигенетического регулятора экспрессии генов. Известно, что днРНК способны взаимодействовать с белками SUZ12 и EZH2. Данное взаимодействие регулирует активность и выбор генов-мишеней поликомб-PRC2 комплекса. Известно также, что взаимодействие компонентов PRC2 с днРНК приводит к снижению метилтрансферазной активности этого комплекса и, как следствие, модуляции экспрессии PRC2-зависимых генов.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что антионкогенное и проапоптотическое действие днРНК GAS5 в клетках обусловлено модуляцией компактизации/декомпактизации хроматина через взаимодействие этой днРНК с компонентами поликомб-репрессивного комплекса PRC2.

\* Работа поддержана финансированием по бюджетному проекту ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-117020210023-1.  
© Н. Д. Зинченко, Ю. И. Савиновская, М. С. Ермаков, А. А. Нуштаева, Е. В. Кулигина, Д. В. Семенов, 2022

## ЭФФЕКТЫ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ AG1 И AGR2 В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ У ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ И МИГРАЦИИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРАХ КЕРАТИНОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Э. Д. Иванова<sup>1,2</sup>, Н. Ю. Мартынова<sup>1,2</sup>, М. Б. Терёшина<sup>1,2</sup>, А. Г. Зарайский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академ. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

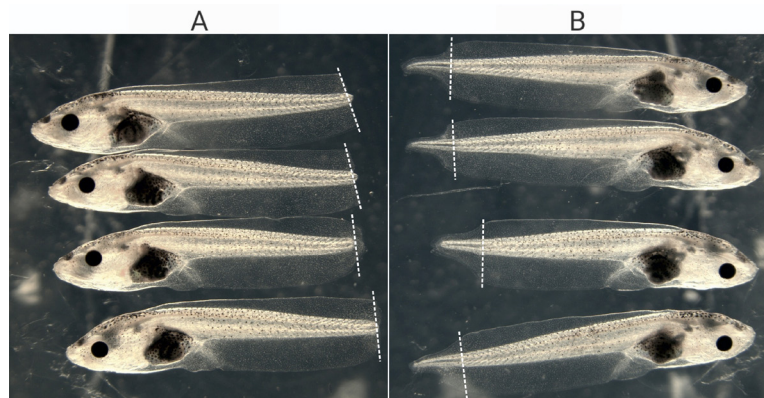
✉ ivanova\_evita@mail.ru

### Аннотация

Регенерация — это процесс восстановления организмами утраченных или повреждённых тканей и органов. В этом процессе участвуют гены переднего градиента Agr: Ag1, Agr2, Agr3. Продукты этих генов являются секретлируемыми белками, благодаря чему они могут действовать как внеклеточные факторы, регулирующие рост и дифференцировку клеток в эмбриогенезе, опухолегенезе и регенерации [1, 2, 3, 4].

Низшие позвоночные, имеющие высокую способность к регенерации, имеют гены семейств Ag1, Agr2 и Agr3, а у высших позвоночных представлены лишь Agr2 и Agr3. Потеря генов Ag1 в ходе эволюции может быть фактором, определяющим низкую способность к регенерации у высших позвоночных [4]. Продукты генов Ag1 и Agr2 являются протеиндисульфидизомеразы (ПДИ), но в отличие от других ПДИ, они являются секретлируемыми, что позволяет действовать на организмы извне [4]. Целью настоящей работы является выделение рекомбинантных белков Ag1 и Agr2, проверка их функциональной активности на модели головастиков *X. laevis*, а также изучение эффекта этих белков на культуры кератиноцитов и фибробластов человека.

В ходе исследования были получены рекомбинантные белки Ag1 (*X. laevis*) и Agr2 (*X. laevis* и *M. musculus*) с полигистидиновой меткой в бактериальной экспрессионной системе *E. coli*. Выделение и очистка рекомбинантных белков проводилась методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Чистоту полученных белков оценивали с помощью анализа SDS-PAGE. Удаление полигистидиновой метки проводили направленным протеолизом TEV-протеиназой по введенной в гибридный белок специфичной последовательности и эффективность удаления полигистидиновой метки оценивали с помощью иммуноблоттинга с использованием анти-6His моноклональных антител. Для проверки функциональной активности белков их добавляли в среду, где инкубировались головастики *X. laevis* с ампутированными хвостами в стадии рефрактерности (стадии 45–47). Головастики на данной стадии являются удобной моделью для изучения продуктов генов Agr, поскольку у них подавлена способность регенерации хвоста в связи с блокированием активации экспрессии этих генов [5]. Анализ регенерации (рис.) проводили на 5 и 7 день после ампутации путем подсчета процента полностью регенерировавших хвостов от числа зародышей в чашке. В серии экспериментов было показано, что инкубация головастиков после ампутации кончика хвоста в среде, содержащей рекомбинантные белки в концентрациях от 1 до 3 мкг/мл, приводила к значительному увеличению процента нормально регенерирующих головастиков.



Регенерация хвостов у головастиков *X. laevis* в контроле (А) и при добавлении рекомбинантного белка Ag1 в концентрации 3 мкг/мл (В)

Для изучения эффекта белков на клетки человека их инкубировали с клеточными культурами иммортализованных фибробластов и кератиноцитов человека. Добавление Agr2, как и Ag1, вызывало сравнимое ускорение миграции человеческих кератиноцитов в скретч-тесте по сравнению с контролем. В отличие от кератиноцитов, Agr2 не вызывал существенного эффекта на миграцию фибробластов, а Ag1 немного ее увеличивал по сравнению с контролем.

#### **Результаты работы**

Разработана методика выделения и очистки белков семейств Ag и Agr, функциональная активность которых была подтверждена в ходе экспериментов на *X. laevis*. Эффекты этих белков на культуры клеток человека могут быть предпосылкой для их использования в регенеративной медицине.

#### **Литература**

1. Persson S. et al. Diversity of the protein disulfide isomerase family: identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family // *Mol Phylogenet Evol.* 2005. V. 36(3). P. 734–740.
2. Aberger F., Weidinger G., Grunz H., Richter K. Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2 // *Mech Dev.* 1990. V. 72(1-2). P. 115–130.
3. Gray T. A. et al. Anterior Gradient-3: a novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models // *J Immunol Methods.* 2012. V. 378, P. 20–32.
4. Ivanova A. S., Tereshina M. B., Ermakova G. V., Belousov V. V., Zaisky A. G. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles // *Sci Rep.* 2013 V. 3. P. 1279.
5. Ivanova A. S., Tereshina M. B., Araslanova K. R., Martynova N. Y., Zaisky A. G. The Secreted Protein Disulfide Isomerase Ag1 Lost by Ancestors of Poorly Regenerating Vertebrates Is Required for *Xenopus laevis* Tail Regeneration // *Front Cell Dev Biol.* 2021. V. 9. 738940.



## CORRECTION OF LIPOPEROXIDATION PROCESS INTENSITY IN CHICKS DURING TREATMENT OF DERMANYSSOSIS

E. N. Indyuhova<sup>1</sup>, M. V. Arisov<sup>1</sup>, V. I. Maximov<sup>2</sup>, T. O. Azarnova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant — a branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV”

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin»

✉ indyuhova@vniigis.ru

### Abstract

Some features of lipid peroxidation processes in chicks of egg breed have been considered in terms of molecular biology during treatment of a parasitic disease (dermanyssosis) with a combined drug (active substances are ivermectin and butaphosphan). At the same time, a pronounced decrease in lipid peroxidation products was found in the blood of the chickens during the use of the above drug. The role of the “leading” thyroid hormone  $T_3$  was observed in maintaining the antioxidant status in the chicks.

All living systems are inextricably linked with the environment that determines the course of their physiological and biochemical processes. In particular, abiotic and biotic factors of a certain strength cause a stress response in the birds. The latter is phasic in nature; however, taking into account modern ideas on stressful conditions, it is possible to single out a key link here, oxidative stress. Its induction is associated with a disrupted integrity of cellular structures, inactivated enzymes, impaired functional status of membrane and receptor complexes, and destructed lipids, proteins, nucleic acids, etc. Oxidative stress is based on excessive activation of free radical processes and, as a result, lipid peroxidation. Correction of the said processes is a topical area for modern biology and for the poultry industry. The latter was mentioned in a series of our studies on effects of a biological stress factor of extreme strength, *Dermanyssus gallinae* (causative agent of dermanyssosis) on Hy-Line laying hens.

The birds were given an ivermectin-and-butaphosphan-based drug orally by a group method with drinking water at a daily dose of 400 µg of ivermectin per 1 kg of bird weight, which corresponds to 1 mL/L of drinking water. The drug was used three times according to the Instructions for Use. Studies in dynamics of the change in lipid peroxidation product concentration, antioxidant activity of blood serum and the “leading” thyroid hormone  $T_3$  found the following. The birds' blood with gamasid mite parasitism showed an increase in lipids containing isolated double bonds by 2,3 ( $P < 0,001$ ), diene conjugates, by 2,1 ( $P < 0,001$ ), triene conjugates, by 2,4 ( $P < 0,001$ ), oxodiene conjugates, by 1,7 ( $P < 0,01$ ), and Schiff's bases, by 2,5 ( $P < 0,001$ ) compared with the healthy birds (control group). At the same time, the birds showed a significant decrease in antioxidant activity of blood serum by 18,1 % ( $P < 0,01$ ), and free triiodothyronine by 1,4 ( $P < 0,01$ ) before treatment as compared to the control.

A significant decrease in poultry red mite population was detected during the treatment. For 20 days of research, the change in antioxidant activity of blood serum was of a peak-like nature. The value of the declared parameter was 3.8 % higher on day 10 than the control. At the same time, a pronounced tendency was detected for a decrease in all studied lipid peroxidation products in the chicks' blood during the treatment of dermanyssosis. At the same time, a reverse nature of the changes was found in free triiodothyronine. This may have provided further protection against free radicals. Thyroid hormones are known to have antioxidant activity that is due to phenolic groups in their molecules.

Thus, over 20 days of observations, a pronounced decrease in peroxidation products was recorded in the chicks' blood during the treatment of dermanyssosis, that creates favorable prerequisites for further existence of the birds in the industrial sector.

## ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ NANOSTRING GEOMX ДЛЯ АНАЛИЗА ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ И ОБОДОЧНОЙ КИШКИ \*

Е. О. Казакова<sup>1</sup>, П. С. Ямщиков<sup>1,2</sup>, М. Р. Патышева<sup>1,2</sup>, А. Д. Казакова<sup>1</sup>, А. С. Тарасова<sup>2</sup>,  
С. Г. Афанасьев<sup>2</sup>, В. Н. Стегний<sup>1</sup>, И. В. Ларионова<sup>1-3</sup>, Ю. Г. Кжышковска<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный университет

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт онкологии,

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

<sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск

✉ kazakova.e.o@mail.ru

### Аннотация

Циркулирующие в крови моноциты являются основным пластическим ресурсом опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), которые участвуют в развитии опухоли, ангиогенезе, метастазировании и химиорезистентности. В зависимости от локализации опухоли в прямой или ободочной кишке, мы выявили особенности программирования моноцитов и их связи с опухолевой прогрессией.

Колоректальный рак (КРР) занимает четвертое место в списке наиболее часто диагностируемых злокачественных новообразований [1]. Накопленные клинические, эпидемиологические, патогенетические и молекулярные данные о различиях опухолей прямой (РПК) и ободочной кишки (РОК) позволяют рассматривать КРР как гетерогенную опухоль [2]. Опухлеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются ключевым иммунным компонентом, регулирующим рост и развитие опухоли, а также ответ опухоли на химиотерапевтическое лечение [2]. Было показано, что опухолевое микроокружение ответственно за активацию и изменение фенотипа моноцитов, главного источника ОАМ [3]. Мы проанализировали, как опухоль, локализованная в отделах ободочной и прямой кишки, влияет на программирование моноцитов и их связь с опухолевой прогрессией.

Объектом исследования послужили моноциты периферической крови 62 больных КРР, из которых 17 пациентов с РОК, 12 пациентов с РПК, 14 пациентов с РПК, получавших химиотерапевтическое лечение и 19 здоровых доноров. Для проведения пространственного транскриптомного анализа Nanostring GeoMX DSP использовались парафиновые блоки пациентов с РПК и РОК. Материал исследования был собран на базе клиники НИИ онкологии Томского НИМЦ. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местным комитетом по медицинской этике НИИ Онкологии ТНИМЦ.

Полнотранскриптомное секвенирование и ПЦР в режиме реального времени выявили опухолеспецифическое программирование моноцитов пациентов с КРР по сравнению со здоровыми людьми. Ключевым отличием транскриптома моноцитов пациентов с РОК от пациентов с РПК была повышенная экспрессия гена PFKFB3 у пациентов с РОК. PFKFB3 — это активатор гликолиза, который в настоящее время рассматривается как перспективная мишень для лечения солидных раков. Конфокальная микроскопия показала, что моноцитарные ОАМ, экспрессирующие PFKFB3, массивно инфильтрируют опухоль в ободочной кишке. С помощью технологии Nanostring NGS было показано, что экспрессия PFKFB3 прямо коррелирует с количеством ОАМ и связана с про-опухолевой активностью ОАМ в РОК, но не в РПК. С помощью TCGA данных было установлено, что повышенная экспрессия PFKFB3 была ассоциирована с рецидивом и худшей выживаемостью у пациентов с РОК, но не с РПК.

Таким образом, были выявлены отличительные особенности транскрипционной регуляции моноцитов больных РПК и РОК, ассоциированные с проопухолевым фенотипом ОАМ моноцитарного происхождения и с неблагоприятным прогнозом для пациентов с КРР. Данные результаты открывают перспективу разработки моноцитарно-макрофагальной таргетной иммунотерапии больных раком толстой и прямой кишки.

### Литература

1. Bray, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424 2018.
2. Larionova I, et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol.* 2020
3. Liu Y, Cao X. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cell Mol Immunol.* 2015.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-15-00151 и Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29.09.2021 № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).

© Е. О. Казакова, П. С. Ямщиков, М. Р. Патышева, А. Д. Казакова, А. С. Тарасова, С. Г. Афанасьев, В. Н. Стегний, И. В. Ларионова, Ю. Г. Кжышковска, 2022

**ПОИСК НОВЫХ ПРИРОДНЫХ МОДУЛЯТОРОВ ИОННОГО КАНАЛА TRPV3\***

А. П. Калиновский, Ю. А. Логашина, Я. А. Андреев, Ю. В. Королькова

*Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*✉ [july@ibch.ru](mailto:july@ibch.ru)**Аннотация**

В результате скрининга растительных экстрактов из лекарственного растения андрографиса метельчатого выделен новый высокоаффинный модулятор ионного канала TRPV3.

TRPV3 — неселективный катионный канал, обильно представленный в кератиноцитах и играющий важную роль в поддержании функции эпидермального барьера, морфогенезе волосяного покрова, а также развитию хронического зуда и различных кожных воспалительных заболеваний. Соединения, модулирующие активность TRPV3, полезны как инструменты для исследования физиологии канала, а также для коррекции патологических состояний, связанных с TRPV3. Экстракты растений представляют собой огромные библиотеки биологически активных молекул, что позволяет находить в них новые высокоселективные соединения, применение которых *in vivo* не сопровождается развитием нежелательных эффектов.

Для поиска новых природных модуляторов была использована эффективная схема разделения растительных экстрактов с параллельным тестированием фракций на клеточной линии СНО, стабильно экспрессирующей TRPV3. Из 10 изученных экстрактов лекарственных и дикорастущих растений наибольшую активность проявил спиртовой экстракт андрографиса метельчатого. Активный компонент экстракта был выделен в индивидуальном виде с помощью твердофазной экстракции на обращенной фазе с последующей очисткой высокоэффективной жидкостной хроматографией. Структура индивидуального компонента была разрешена по данным масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Найденный активный компонент относится к группе лабдановых дитерпеноидов. В тестах флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -имиджинга и электрофизиологических тестах соединение значительно подавляло активность TRPV3 в низких ( $< 10 \mu\text{M}$ ) концентрациях, что показано впервые. Дальнейшая работа включает детальное изучение характера и параметров взаимодействия лиганда с ионным каналом в электрофизиологических тестах.

---

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00136.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ПРИ ОПУХОЛЯХ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЦИЙ\*

А. А. Калымбетов, И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, М. В. Шипунов, О. П. Хрипко

*Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*

✉ akalymbetov@gmail.com

### Аннотация

В настоящее время с развитием таргетной терапии молекулярно-генетические исследования при онкологических заболеваниях вошли в рутинную практику врачей онкологов. Активирующие мутации в генах, регулирующих пролиферацию, встречаются в 20–30 % всех онкологических заболеваний и доходят до 50 % при некоторых типах опухолей. Наиболее часто в клинической практике исследуются мутации RAS-MAPK киназного каскада. Наличие различных мутаций связано не только с эффективностью ряда противоопухолевых препаратов, но и большей агрессивностью некоторых генетических вариантов опухолей, что делает определение генетического портрета опухоли необходимым как для выбора терапии, так и для прогноза течения заболевания.

**Цель** — проанализировать особенности мутаций в гене BRAF у пациентов с онкологическими заболеваниями различной локализации

В исследование были включены 165 пациентов с различными локализациями опухолевых заболеваний: из них 114 пациентов с новообразованиями ЖКТ, 4 пациента с новообразованиями печени и ЖВП, 9 пациентов с новообразованиями поджелудочной железы (ПЖ), 24 пациента с меланомой, а также по 1 образцу опухолей почки, вульвы, мочевого пузыря и щитовидной железы (ЩЖ), 6 случаев с неуточненной локализацией и 9 случаев первично-множественных злокачественных новообразований. Выделение ДНК из парафиновых блоков проводилось с использованием набора реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки, согласно инструкции изготовителя. (БиоЛинк, Россия). Определение мутаций методом аллель-специфичной ПЦР проводили с использованием амплификатора CFX-96 (BioRad, USA). Для исследования мутации V600E гена BRAF использовали набор реагентов Real-time-PCR-BRAF- V600E, согласно инструкции изготовителя. (БиоЛинк, Россия).

Онкологические заболевания характеризуются накоплением генетических аномалий в опухолевой клетке, что приводит к изменению сигнальных каскадов и вызывает опухолевую трансформацию и развитие резистентности к химиотерапевтическим средствам.

В результате наших исследований было получено, что активирующая мутация гена BRAF V600E встречается в онкологических заболеваниях следующих локализаций: опухоли ЖКТ, меланомы и при онкологических заболеваниях неуточненной локализации (табл.). Статистически значимо данный вид мутации более часто встречается у пациентов с меланомой (54 %), чем у пациентов с опухолями ЖКТ (5 %), при этом частота встречаемости таких мутаций у пациентов с онкологическим заболеванием неуточненной локализации составляет 33 % и статистически не отличается от остальных групп, что скорее всего связано с неоднородностью данной группы онкологического процесса, для которого не установлен первичный очаг опухоли.

### Результаты тестирования образцов опухоли на наличие активирующей мутации гена BRAF V600E

	Локализация опухоли	Опухоли ЖКТ	Печени и ЖВП	ПЖ	Меланома	Первично множественный рак	Онкологическое заболевание неуточненной локализации	ЩЖ	Почка	Мочевой пузырь	Вульва
BRAF	Мутантный вариант	6	0	0	13	0	2	0	0	0	0
	Дикий тип	108	4	4	11	9	4	1	1	1	1
Всего		114	4	4	24	9	6	1	1	1	1

\* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

---

Таким образом, мутация гена BRAF V600E встречается не только у пациентов с меланомой, но и у пациентов с онкологическими заболеваниями других локализаций, что может позволить использование ингибиторов BRAF, в терапии пациентов. Необходимо проведение дополнительных клинических исследований по изучению ингибиторов BRAF на больных онкологическими заболеваниями ЖКТ и солидными опухолями различных локализации с наличием мутаций BRAF V600.

## MOLECULAR MAPPING OF CHROMOSOME BREAKS REVEALED THREE LARGE FRAGILE GENES SPECIFIC TO INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

A. V. Kislova, P. S. Sviridov, V. O. Pozhitnova, E. I. Fefelova, E. P. Gadzhieva, E. S. Voronina, D. G. Zheglo

*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation*

✉ anastasiiakislovav@gmail.com

### Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a model for embryogenesis and a tool for regenerative medicine. Accumulation of chromosomal aberrations in iPSCs is presumably caused by replication stress. The most vulnerable to replication stress genomic regions are referred to as common fragile sites (cFSs). Three specific to iPSCs cFSs on chromosomes 2 and 12 were revealed in this study.

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) present a valuable model for embryogenesis of all tissue types and a promising tool for regenerative medicine [1]. Accumulation of chromosomal aberrations during rapid PSC proliferation both in vivo and in vitro is presumably caused by replication stress. The most vulnerable to replication stress genomic regions are referred to as common fragile sites (cFSs). cFSs are prone to formation of focal copy number variations, frequently coincide with large genes, and can be detected as recurrent breaks on metaphase chromosomes under exposure to replication stress [2].

The iPSC line RCMGi001-A was obtained through reprogramming of the skin fibroblasts with a homozygous CFTR F508del using CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit and characterized earlier. Culture medium was supplemented with aphidicolin, an inhibitor of replicative polymerases, for 18-24h, followed by standard cytogenetic preparation of metaphase spreads. FISH was performed with custom probes obtained by nick-translation labelling of long-range PCR amplicons. Three fragile bands on chromosomes 2 and 12 were revealed by differential staining using DAPI contrasted with actinomycin D. To map the location of the cFSs at a higher resolution three pairs of FISH probes specific to flanking regions of the largest genes of each band were hybridized to metaphase chromosomes of aphidicolin-treated iPSC. Chromosomal breaks at each band were detected to localize between the two FISH signals indicating that the hotspot of instability reside within the gene body.

The cFS on chromosome 12 was located in the *ANKS1B* gene. Chromosome 2 contained cFSs in the *NRXN1* and *LRP1B* genes. These genes are involved in the development and normal functioning of the nervous system. Disturbances in their work are associated with various neurological disorders and neurodegenerative diseases [3, 4, 5]. The fact that they are sensitive to replication stress in iPSC may indicate that replication stress inherent in early embryogenesis and consequent somatic variants at these loci can impact to disease onset. Revealed cFSs can serve as sensitive biomarkers of suboptimal cultivation and genome instability of iPSCs intended for further clinical applications.

### References

1. Omole A.E., Fakoya A.O.J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications // *PeerJ*. 2018. № MAY(6). C. 4370. DOI:10.7717/PEERJ.4370.
2. Ji F., Zhu X., Liao H., Ouyang L., Huang Y., Syeda M.Z., Ying S. New Era of Mapping and Understanding Common Fragile Sites: An Updated Review on Origin of Chromosome Fragility // *Frontiers in Genetics*. 2022. (13). DOI:10.3389/FGENE.2022.906957.
3. Younis R.M., Taylor R.M., Beardsley P.M., McClay J.L. The ANKS1B gene and its associated phenotypes: focus on CNS drug response // *Pharmacogenomics*. 2019. № 9(20). C. 669. DOI:10.2217/PGS-2019-0015.
4. Castronovo P., Baccarin M., Ricciardello A., Picinelli C., Tomaiuolo P., Cucinotta F., Frittoli M., Lintas C., Sacco R., Persico A.M. Phenotypic spectrum of NRXN1 mono- and bi-allelic deficiency: A systematic review // *Clinical genetics*. 2020. № 1(97). C. 125-137. DOI:10.1111/CGE.13537.
5. Ulery P.G., Strickland D.K. LRP in Alzheimer's disease: friend or foe? // *The Journal of Clinical Investigation*. 2000. № 9(106). C. 1077-1079. DOI:10.1172/JCI11455.

## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS\*

Т. А. Козлова, М. А. Тюменцев, Е. А. Рудницкая, Н. А. Стефанова

Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

✉ kozlovatanya21@gmail.com

### Аннотация

Болезнь Альцгеймера — нейродегенеративное заболевание, развитие которого среди прочего связано с нарушением функционирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и снижением мозгового кровотока. В своем исследовании на крысах линии OXYS мы показали, что одной из предпосылок сопровождающей нейродегенерацию цереброваскулярной дисфункции может являться нарушение формирования ГЭБ в ранний постнатальный период.

Болезнь Альцгеймера (БА) — неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется снижением когнитивных способностей, наблюдаемым на фоне накопления нейротоксических форм амилоида- $\beta$ , дисфункции митохондрий, гиперфосфорилирования тау-белка. Кроме того, развитие БА связано с нарушением функционирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и снижением мозгового кровотока. Предполагается, что предпосылки этих изменений могут возникать в раннем возрасте во время формирования ГЭБ, но возможная взаимосвязь между измененным формированием ГЭБ и его дисфункцией в более позднем возрасте практически не исследована. Для изучения этого вопроса необходимы биологические модели заболевания. Адекватной моделью наиболее распространенной (>95 % случаев) спорадической формы БА являются крысы линии OXYS, у которых развиваются все ключевые признаки заболевания при отсутствии характерных для ранней формы заболевания мутаций в генах *App*, *Psen1* и *Psen2*.

Целью настоящей работы явилось исследование формирования ГЭБ в гиппокампе и префронтальной коре крыс OXYS и Вистар (контроль) в период раннего постнатального развития (возраст 0-20 дней). Длину и процентное содержание плотных контактов (ПК), а также количество эндотелиальных митохондрий и площадь перичитов в гиппокампе оценивали методом электронной микроскопии. Уровень белка окклюдина — основного компонента ПК — оценивали в гиппокампе и префронтальной коре вестерн-блот анализом.

Исследование морфологических особенностей эндотелия гиппокампа показало, что длина ПК у крыс OXYS была ниже в 7-дневном возрасте и выше в 20-дневном возрасте по сравнению с крысами Вистар. Процентное содержание ПК было ниже в возрасте 14 дней у крыс OXYS. Также показано, что количество эндотелиальных митохондрий было ниже в гиппокампе крыс OXYS в возрасте 14 дней ( $p < 0,05$ ). Этот результат может указывать на снижение энергоснабжения эндотелия гиппокампа крыс OXYS в конце второй постнатальной недели. Оценка площади перичитов показала, что в возрасте 14 дней >95 % капилляров были окружены перичитами в гиппокампе крыс Вистар, тогда как это имело место только для 30 % капилляров крыс OXYS (U-критерий Манна-Уитни:  $p < 0,05$ ). К возрасту 20 дней эти межлинейные различия исчезали, что может указывать на задержку развития, но не нарушение структуры сосудов у крыс OXYS.

Не было выявлено достоверных межлинейных различий в уровне белка окклюдина в гиппокампе и префронтальной коре крыс Вистар и OXYS. Содержание окклюдина закономерно возрастало с возраста 3 до 7 дней в префронтальной коре крыс обеих линий.

Таким образом, выявлена задержка формирования кровеносных сосудов в гиппокампе 14-дневных крыс OXYS. К периоду завершения созревания мозга — возрасту 20 дней — различия между крысами Вистар и OXYS нивелировались. Можно предположить, что выявленные особенности формирования сосудов могут способствовать развитию цереброваскулярной дисфункции и, как следствие, признаков БА в дальнейшем.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-15-00044.

## SARS-COV-2 DETECTION USING MALDI-TOF AND MACHINE LEARNING APPROACH

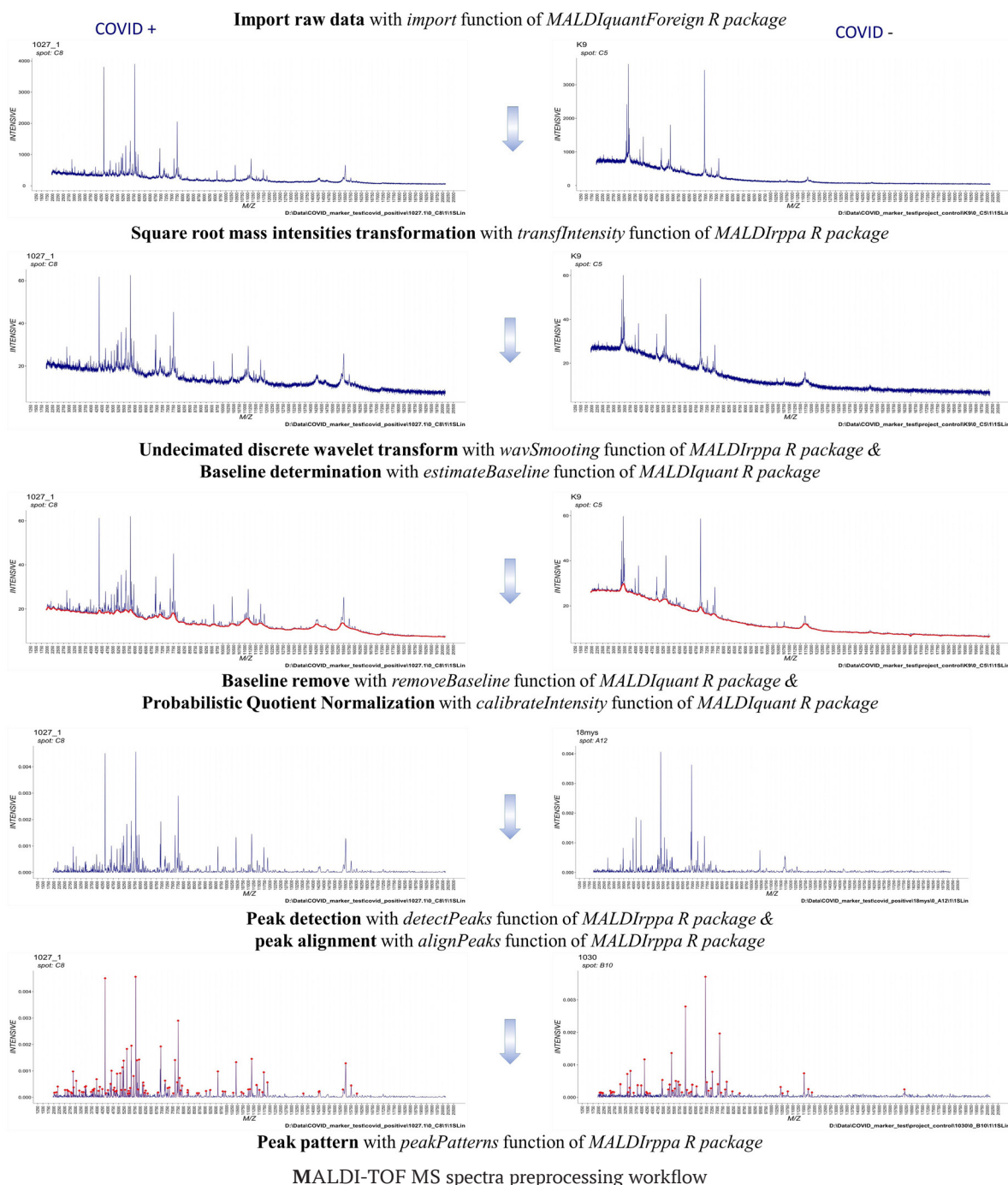
S. I. Kolesnichenko, I. A. Kadyrova, I. V. Korshukov, Ye. A. Kolesnikova, V. I. Barkhanskaya, D. B. Babenko

Shared Resources Laboratory, Karaganda Medical University, Karaganda, Kazakhstan

✉ kolesnichenko@kgmu.kz

### Abstract

COVID-19 became a travail for humanity and for the healthcare system. The pandemic revealed many gaps in the organization of medical and diagnostic processes and it led to the collapse of the inpatient and laboratory services during the highest incidence. Here, we present the express method for detecting the SARS-CoV-2 virus in nasal swabs using a combination of MALDI-MS and a machine learning approach.





## Objectives

Machine learning methods (ML) are often used to solve medical problems. We used ML to search in the mass spectrum for structures corresponding to the distribution of molecular peaks specific to SARS-CoV-2. However, RT-PCR is considered as the gold standard for detecting viral RNA in nasopharyngeal swabs (NS), but it is time-consuming and requires constant changes in the primers composition due to the mutation of SARS-CoV-2 strains. We propose a method for the detection of SARS-CoV-2 in NS using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and the ML approach.

## Methods

Nasal swabs from patients with PCR-confirmed COVID-19 and control participants were tested (130 and 80 swabs respectively) with MALDI-TOF MS MicroFlex LT (v 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using HCCA matrix [1]. MALDI spectra were preprocessed in R package using wavelet smoothing, Statistics-sensitive Non-linear Iterative Peak-clipping (SNIP) algorithm baseline removing [2], filtering of the samples on intensities and signal-to-noise ratio (Fig.); calibration was done on the probabilistic quotient normalization (PQN) [3-5]. Peak detection was performed with the median absolute deviance (MAD) method. Peak alignment was performed using 70 % minFreq and 0,005 tolerance.

## Results

ML approaches included GLM, RT, RuleFeat Ensemble Model. Obtained models were characterized with specificity, sensitivity and F1 score. GLM (specificity = 1, sensitivity = 0,5) model showed low F1 score (0,4). However, RT and RuleFeat Ensemble Models demonstrated sensitivity, specificity and F1 score equal 1 after optimization.

## Conclusion

Thus, we propose a screening method for SARS-CoV-2 detection (sensitivity 1, specificity 1). The developed methodology, combines the analysis of NS samples using the MALDI-TOF-MS with ML approaches, is suitable for screening patients with COVID-19 at the first stages of diagnosis. RT and RuleFeat Ensemble Models demonstrated high sensitivity, specificity and F1 scores.

## References

1. Fabiane M. Nachtigall, Alfredo Pereira, Oleksandra S. Trofymchuk, Leonardo S. Santos. Detection of SARS-CoV-2 in nasal swabs using MALDI-MS // *Nature biotechnology*. 2020. V. 38. P. 1168–1173.
2. Coombes K.R., Tsavachidis S., Morris J.S. et al. Improved peak detection and quantification of mass spectrometry data acquired from surface-enhanced laser desorption and ionization by denoising spectra with the undecimated discrete wavelet transform // *Proteomics*. 2005. V. 5. P. 4107–4117.
3. McCullagh, P., Nelder, J.A. *Generalized Linear Models*. London: Chapman & Hall. 1989.
4. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. *Classification and Regression Trees*. New York: Chapman and Hall. 1984.
5. Breiman, L. *Random Forests*. *Machine Learning*. 2001. V. 45. P. 5–32.

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК ЧЕЛОВЕКА LINC00493**

Д. О. Кони́на<sup>1</sup>, П. А. Спарбер<sup>2</sup>, Ю. В. Вяхирева<sup>2</sup>, А. Ю. Филатова<sup>2</sup>, М. Ю. Скоблов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

<sup>2</sup>Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова, Москва

✉ darya.konina@phystech.edu

**Аннотация**

Развитие методики рибосомного профилирования позволило обнаружить, что значительная часть длинных некодирующих РНК (днРНК) связана с рибосомами. Недавние исследования подтвердили возможную бифункциональность днРНК, несущих короткие открытые рамки считывания (кОРС, < 100 аминокислот). Экспериментально было показано, что транслируемые с кОРС небольшие белки могут быть функционально значимыми.

В данной работе была исследована широко экспрессируемая длинная некодирующая РНК LINC00493. Бионформатический анализ и экспрессионный анализ на 11 клеточных линиях человека показали, что LINC00493 высоко представлена во многих клеточных линиях и тканях человека и имеет профиль экспрессии, который позволяет отнести данный ген к группе «генов домашнего хозяйства». Впервые была определена точная экзон-интронная структура LINC00493, с использованием ОТ-ПЦР и RACE (rapid amplification of cDNA ends) анализа. Две основные изоформы были зарегистрированы в GeneBank под номерами MW979249 и MW979250.

Для определения функции была исследована внутриклеточная локализация днРНК, проведено изучение влияния нокдауна и оверэкспрессии на жизнеспособность и подвижность клеток. Цитоплазматическая локализация днРНК установлена с использованием процедуры мягкого лизиса. Влияние на жизнеспособность и подвижность клеток оценивалось с помощью MTT и wound healing тестов, соответственно. По результатам нокдауна было показано, что LINC00493 влияет на жизнеспособность клеток в зависимости от типа клеток.

В процессе работы был исследован кодирующий потенциал LINC00493. Было доказано, что LINC00493 имеет кОРС, которая кодирует небольшой белок SMIM26. Чтобы исследовать влияние на жизнеспособность клеток белка SMIM26 и транскрипта LINC00493 в отдельности, были сконструированы векторы для экспериментов по оверэкспрессии. Проведено клонирование полноразмерной кДНК LINC00493 в вектор pcDNA3.1-GFP, а также получен вектор с мутацией в старт кодоне SMIM26. Проведённые эксперименты по нокдауну и оверэкспрессии LINC00493 позволили предположить, что на жизнеспособность клеток влияет как белок SMIM26, так сама последовательность транскрипта LINC00493, при этом влияние это противоположно.

**СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
(ИНГИБИТОРА ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1)  
В СОЧЕТАНИИ С ТОПОТЕКАНОМ (ИНГИБИТОРОМ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I)  
НА МОДЕЛЬ ОПУХОЛИ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС *IN VIVO***

Т. Е. Корниенко<sup>1</sup>, А. Л. Захаренко<sup>1</sup>, В. П. Николин<sup>2</sup>, Н. А. Попова<sup>2,4</sup>, А. С. Филимонов<sup>3</sup>, О. А. Лузина<sup>3</sup>,  
А. Д. Рогачев<sup>3,4</sup>, А. А. Охина<sup>3,4</sup>, Н. Ф. Салахутдинов<sup>3,4</sup>, О. И. Лаврик<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,

<sup>4</sup>Новосибирский государственный университет

✉ t.kornienko1995@gmail.com

### Аннотация

В данной работе мы проверили эффективность сочетанного применения ингибитора Top1 — топотекана и производного усниновой кислоты ОЛ9-116 — ингибитора Tdp1 при одновременном введении и с совмещением пиков их максимальной концентрации в крови мышей в отношении карциномы легких Льюис. Комбинация ОЛ9-116 и топотекана с совмещением пиков их максимальных концентраций оказалась наиболее эффективной схемой лечения.

### Введение

Tdp1 — один из ключевых ферментов репарации ДНК, который играет важную роль в устранении повреждений ДНК, поскольку участвует в восстановлении ковалентных комплексов Top1-ДНК (Top1cc), гидролизует фосфодиэфирную связь между 3'-концом ДНК и тирозильным фрагментом Top1. Комплексы Top1-ДНК могут быть стабилизированы камптотецином и его клиническими производными топотеканом и иринотеканом. Tdp1 также может устранять другие типы повреждений, вызванных широко применяемыми в клинике противоопухолевыми препаратами. [1].

Ранее мы обнаружили, что производное усниновой кислоты ОЛ9-116 [2] является эффективным ингибитором Tdp1 ( $IC_{50} = 0,16 \mu M$ ). ОЛ9-116 усиливает действие противоопухолевого препарата топотекана как *in vitro*, так и *in vivo* [3]. По данным фармакокинетического анализа, проведенного нашим коллективом, максимальная концентрация ОЛ9-116 в крови мышей достигается через 3–4 часа после введения препарата. Мы предположили, что комбинированное введение ОЛ9-116 и топотекана с совмещением их максимальной концентрации в крови может усилить их противоопухолевое действие.

### Материалы и методы

В исследовании мы использовали мышей линии C57BL/6. Экспериментальной моделью опухоли служила карцинома легких Льюис (при подкожной или внутримышечной прививке образует опухолевый узел и в дальнейшем дает метастазы в легкие), трансплантировали ее мышам внутримышечно. Животные были разделены случайным образом на 6 групп: 1 группа — контроль без лечения; 2 группа — ДМСО + Tween-80; 3 группа — топотекан; 4 группа — топотекан + ОЛ9-116 одновременно; 5 группа — ОЛ9-116+ топотекан (с разницей в 3 часа, что позволяет совместить максимальную концентрацию препаратов в крови); 6 группа — ОЛ9-116.

### Результаты

Комбинированное применение ОЛ9-116 и топотекана в 5 группе с совмещенными пиками концентрации препаратов оказалось более эффективным в отношении веса и размера первичного опухолевого узла по сравнению с остальными группами. Данная схема введения комбинации препаратов оказалась нетоксичной и приводит к нормализации гемопоза по сравнению с одновременным применением этих препаратов и с введением их в монорежиме.

### Заключение

Таким образом, производное усниновой кислоты ОЛ9-116 может являться перспективным дополнением к основной терапии противоопухолевыми препаратами, так как сочетанное применение ОЛ9-116 и топотекана с совмещением их максимальных концентраций в крови в указанной схеме введения нетоксично, обладает противоопухолевой активностью и нормализует гемопоз.

<sup>\*</sup> Исследование поддержано грантом РФФ № 21-14-00105.

**Литература**

1. Comeaux E. Q., van 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 Metab. Rev.* — 2014, V. 46, P. 494–507.
2. Luzina O.A., et al., Synthesis and Biological Activity of Usnic Acid Enamine Derivatives // *Chem. Nat. Compd.* — 2015, V.51, P. 646–651.
3. Nikolin V.P., et al., The influence of an enamine usnic acid derivative (a tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor) on the therapeutic effect of topotecan against transplanted tumors in vivo // *Clin. Exp. Metastasis* — 2021, V. 38, P. 431–440.

## РОЛЬ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕЦИДИВЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВЕНОЗНОГО РЕФЛЮКСА \*

В. А. Короленя<sup>1,5</sup>, К. С. Севостьянова<sup>2,5</sup>, К. А. Гаврилов<sup>2,3</sup>,  
А. И. Шевела<sup>1-3</sup>, М. Л. Филипенко<sup>1,2</sup>, М. А. Сметанина<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Центр новых медицинских технологий, Новосибирск

<sup>3</sup>Новосибирский государственный университет

✉ korolenyavalerialan@gmail.com

### Аннотация

Полученные нами ранее данные об экспрессии гена одного из изомеров актинового филамента (*ACTA1*), а также литературные данные приводят к формированию гипотезы о роли регуляторов ремоделирования цитоскелета (*PLXNA4* и *SEMA3A*) в рецидиве патологического венозного рефлюкса при варикозной болезни нижних конечностей после проведения веносохраняющей процедуры ASVAL.

Варикозная болезнь нижних конечностей (ВБНК) является широко распространенной патологией, последствия которой могут привести к серьезному ухудшению качества жизни. Исследование частоты рецидивов патологического рефлюкса после процедур ASVAL (амбулаторная селективная абляция варикозных вен под местной анестезией) [1] привело к формированию гипотезы о связи продолжительности венозного рефлюкса с патологическими молекулярными процессами в венозной стенке.

Исследователи полагают, что изменения в изомерном составе актиновых филаментов могут приводить к фенотипу болезни [2]. Наши предыдущие исследования показали различия в экспрессии гена альфа-актина скелетных мышц (*ACTA1*) между группами пациентов с разной протяженностью патологического рефлюкса в большой подкожной вене [3].

Полученные данные подтолкнули нас исследовать экспрессию гена *PLXNA4* (плексин-А4), ответственного за ремоделирование цитоскелета [4], и гена *SEMA3A* (семафорин-3А), продуктом которого является секретрируемый во внеклеточное пространство лиганд рецептора PLXNA4. Экспрессию этих генов исследовали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Нормализованные на *GAPDH* и *ACTB* относительные количества мРНК из парных варикозно-измененных (ВВ) и неизмененных (НВ) сегментов вен сравнивали с помощью парного критерия Вилкоксона (см. таблицу).

### Экспрессия генов *PLXNA4* и *SEMA3A* в группах пациентов с разным шансом рецидива рефлюкса после ASVAL

Название гена	Низкий шанс рецидива рефлюкса		Высокий шанс рецидива рефлюкса	
	ВВ/НВ (ДИ)	p-value	ВВ/НВ (ДИ)	p-value
<i>PLXNA4</i>	1,76 (1,04-2,97)	0,04	1,01 (0,65-1,56)	0,84
<i>SEMA3A</i>	1,58 (0,65-3,33)	0,02	0,80 (0,21-2,02)	0,60

Таким образом, была показана потенциальная роль регуляции ремоделирования цитоскелета в рецидиве патологического венозного рефлюкса в БПВ после веносохраняющей процедуры ASVAL. *PLXNA4* и *SEMA3A* представляют интерес в качестве потенциальных терапевтических мишеней [5]. Изучение механизмов ремоделирования актинового цитоскелета при ВБНК в будущем может способствовать разработке методов лечения, снижающих частоту рецидивов патологического венозного рефлюкса.

### Литература

1. Zolotukhin I.A., Seliverstov E.I., Zakharova E.A., Kirienko A. I. Short-term results of isolated phlebectomy with preservation of incompetent great saphenous vein (ASVAL procedure) in primary varicose veins disease // *Phlebology*. 2017. V. 32 Is. 9 P. 601-607. <https://doi.org/10.1177/0268355516674415>

2. Suresh R., Diaz R. J. The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer // *Transl Oncol*. 2021. V. 14 Is. 6 P. 101051. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101051>.

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке ПФНИ РФ 0245-2021-0006 в рамках научного проекта №121031300045-2 «Фундаментальные основы здоровьесбережения».

© В. А. Короленя, К. С. Севостьянова, К. А. Гаврилов, А. И. Шевела, М. Л. Филипенко, М. А. Сметанина, 2022.

3. Короленя В.А., Гаврилов К.А., Севостьянова К.С., Шевела А.И., Золотухин И.А., Филипенко М.Л., Сметанина М.А. Изменение экспрессии гена АСТА1, связанное с патологическим рефлюксом при варикозной болезни нижних конечностей. Тезисы докладов XIV Научно-практической конференции Ассоциации флебологов России, Казань, 26–29 мая 2022 г. // Флебология. 2022. Т. 16(2-2). С. 41. <https://doi.org/10.17116/flebo2022160225>

4. Fan L., Yan H., Pellegrin S., Morigen, Mellor H. The Rho GTPase regulates cytoskeletal signaling from plexinA4 to promote neurite retraction // *Neurosci Lett.* 2015. V. 590 P. 178-183. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.010>

5. Worzfeld T., Offermanns S. Semaphorins and plexins as therapeutic targets // *Nat Rev Drug Discov.* 2014. V. 13 Is. 8. P. 603-621. <https://doi.org/10.1038/nrd4337>

## NGS-ПАНЕЛЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

М. А. Корюков, А. А. Кечин, М. Л. Филипенко

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

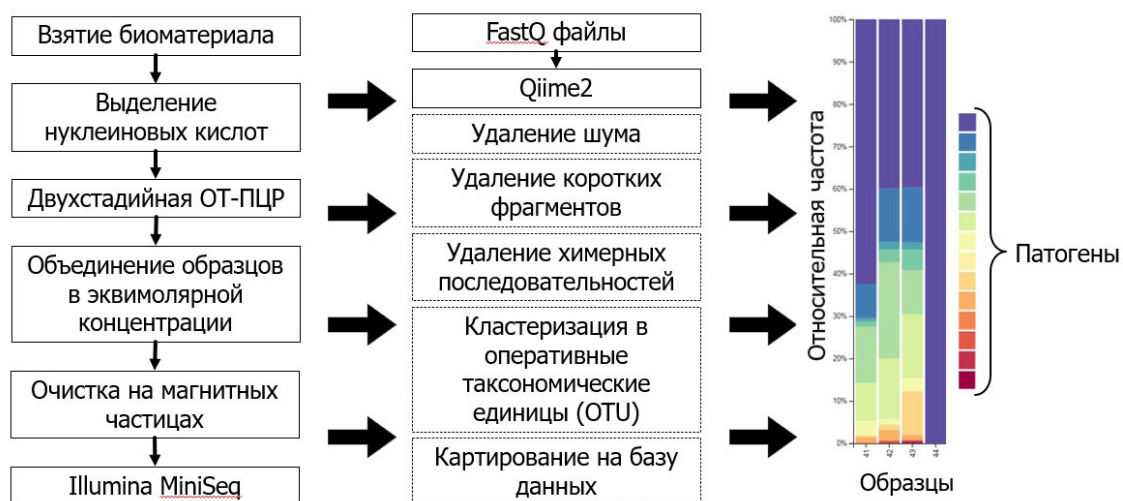
✉ mkoryukov@gmail.com

### Аннотация

Острые респираторные инфекции (ОРИ) являются одной из лидирующих причин заболеваемости и смертности во всем мире. В связи с этим перспективной областью биологии является разработка и усовершенствование методов диагностики ОРИ. В рамках работы была сконструирована NGS-панель, включающая более сотни пар праймеров, которые нацелены на консервативные участки геномов подавляющего большинства патогенов респираторной системы человека.

Несмотря на преимущественно легкое течение многих респираторных инфекций, при определенных обстоятельствах могут возникнуть серьезные осложнения, такие как пневмония и миокардит, которые приводят к значительному росту социально-экономического бремени. Кроме того, в некоторых случаях практически невозможно установить истинную этиологию заболевания, основываясь исключительно на симптоматике, поскольку она идентична для большинства респираторных инфекций. Это нередко влечет за собой назначение неспецифического и неэффективного лечения в виде антибиотиков широкого спектра [1], что еще больше усугубляет ситуацию с устойчивыми к лекарственным препаратам бактериями. Ввиду этого встает вопрос о необходимости своевременной и высокочувствительной диагностики, которая снизит темпы роста количества резистентных штаммов бактерии и уменьшит расходы на неэффективные лекарственные средства.

Вопреки изобилию методов диагностики, многие из них не актуальны в силу низкой чувствительности, трудоемкости и нерентабельности в целом. Золотым стандартом диагностики множества респираторных инфекций является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Современные приборы способны детектировать продукты на разных длинах волн, что позволяет мультиплексировать систему. Однако этот метод не удобен при работе в условиях большого количества образцов и высоко мультиплексированных систем. Одним из наиболее перспективных методов является секвенирование нового поколения (NGS), введение которого в практику может произвести революцию в диагностике респираторных заболеваний. Данный метод имеет ряд преимуществ: получение более подробной информации в виде последовательности нуклеотидов, возможность идентификации микроорганизмов вплоть до серотипа и штамма, перспектива проведения сложных высоко мультиплексированных реакций и секвенирования огромного количества образцов за один запуск секвенатора. Несмотря на очевидные преимущества главным недостатком NGS является высокая стоимость проведения анализа. Однако появление все большего числа технологий секвенирования и их модификаций приводит к ежегодному снижению цен на проведение анализа.



Принцип работы NGS-панели

Целью данной работы является разработка и оптимизация NGS-панели для диагностики инфекций дыхательных путей в образцах назальных мазков пациентов с симптомами ОРВИ.

На основании данных литературы было отобрано 10 бактерий и 39 групп вирусов, вызывающих респираторные заболевания. Для них было выбрано по 2 наиболее консервативных участка генома, на которые с помощью программы NGS-PrimerPlex [2] было сконструировано 108 пар праймеров, эффективность работы которых была оценена при помощи ПЦР с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле. Для панели была разработана методика приготовления библиотеки и обработки данных секвенирования (рис.).

В сотрудничестве с ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского нам было предоставлено более 300 образцов кДНК, которые были заранее проанализированы при помощи ПЦР тест-системы ОРВИ-скрин. Часть из них была секвенирована по нашей методике на платформе Illumina Miniseq. При анализе данных было обнаружено, что большая часть последовательностей представлена гетеродимерами праймеров. Такого рода структуры эффективно образуются, даже несмотря на незначительную энергию Гиббса. Поэтому на данном этапе работа направлена на поиск эффективного способа обогащения смеси целевыми ампликонами. Было показано, что использование буфера, содержащего KCl, при проведении ПЦР снижает долю димеров в 1,85 раза. Помимо этого ведутся попытки экстракции целевых ампликонов из агарозного геля [3], что потенциально может привести к более эффективной очистке от димеров по сравнению с использованием магнитных частиц.

### Литература

1. McNulty C. A. M. и др. Expectations for consultations and antibiotics for respiratory tract infection in primary care: The RTI clinical iceberg // *British Journal of General Practice*. 2013. Т. 63. № 612. С. e429–e436.
2. Kechin A. и др. NGS-PrimerPlex: High-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions // *PLOS Computational Biology*. 2020. Т. 16. № 12. С. e1008468.
3. Abraham O. S. J. и др. A quick and effective in-house method of DNA purification from agarose gel, suitable for sequencing // *3 Biotech* 2017 7:3. 2017. Т. 7. № 3. С. 1–6.



## КОНЬЮГАТЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С АДРЕСУЮЩИМИ ЛИГАНДАМИ, СОДЕРЖАЩИЕ КИСЛОТОЛАБИЛЬНУЮ ФОСФАМИДНУЮ СВЯЗЬ\*

Н. О. Кропачева<sup>1,2</sup>, М. И. Мещанинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ mesch@niboch.nsc.ru

### Аннотация

Конъюгирование олигонуклеотидов с адресующими лигандами посредством стимулчувствительных связей позволит регулировать их внутриклеточный трафик и расширит возможности их применения в терапии. Предложен твердофазный подход к введению транспортных лигандов в олигонуклеотиды различной природы через биodeградируемый линкер, содержащий кислотолабильную фосфамидную связь.

Синтетические олигонуклеотиды и их конъюгаты широко используются в настоящее время в различных областях молекулярной биологии, нанобиотехнологии и биомедицины как инструменты для фундаментальных и прикладных исследований, а также как перспективные средства диагностики и терапии вирусных, онкологических, генетических и других заболеваний человека и животных. Одной из основных задач при создании олигонуклеотидов для терапевтического применения является улучшение их проникновения в клетки [1]. Конъюгирование олигонуклеотидов с адресующими лигандами (например, пептиды и белки, липофильные соединения, малые органические молекулы, наночастицы, аптамеры и др.) посредством биodeградируемых связей [2] позволит регулировать внутриклеточный трафик и функциональную активность терапевтических нуклеиновых кислот.

Нами предложен твердофазный подход к введению транспортных лигандов в олигонуклеотиды различной природы через биodeградируемый линкер, содержащий кислотолабильную фосфамидную связь. Стабильность полученных конъюгатов при pH, близких к нейтральным, и их лабильность в более кислых условиях, соответствующих условиям внутри эндосом и лизосом, позволяют надеяться на высокий биологический эффект такого типа конъюгатов благодаря освобождению олигонуклеотида от транспортера. Подход основан на введении в олигонуклеотид 5'-фосфатной группы на последней стадии автоматического фосфитамидного синтеза, деблокировании всех фосфатных групп, активации 5'-концевого фосфата и его взаимодействию с транспортными лигандами, содержащими первичную аминогруппу (см. рисунок).

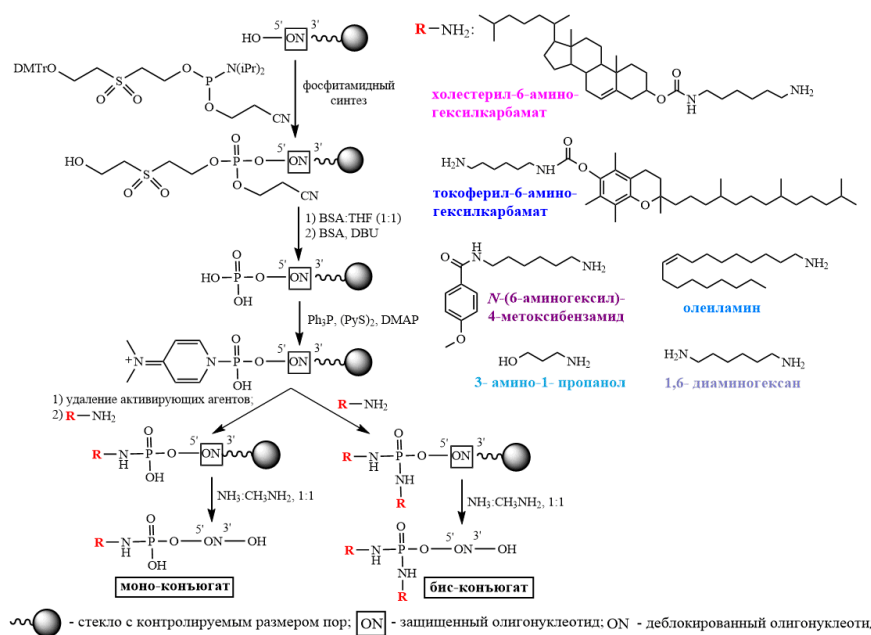


Схема твердофазного метода синтеза конъюгатов олигонуклеотида, содержащих кислотолабильную фосфамидную связь (DMTr — диметокситригил; Pr — пропил; BSA — N,O-бис-(триметилсилил) ацетамид; DBU — 1,8-диазобициклоундец-7-ен; THF — тетрагидрофуран; Ph — фенил; Py — пиридин; DMAP — 4-диметиламино-пиридин)

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 19-14-00251.

В работе были опробованы как коммерчески доступные аминоксодержащие лиганды (олеиламин, 1,6-диаминогексан, 3-амино-1-пропанол), так и специально синтезированные аминоксодержащие производные холестерина,  $\alpha$ -токоферола и 4-метоксибензойной кислоты. В качестве модельных олигонуклеотидов были использованы дезокси(ТТТТТТТТ) и 2'-О-метил(GGCUUGACA). Были оптимизированы условия получения ковалентных конъюгатов с соотношением олигонуклеотид:лиганд = 1:1. С использованием предложенного подхода была получена серия олигонуклеотидных конъюгатов и исследована стабильность фосфамидной связи в их составе при различных рН.

Разработанный твердофазный метод можно рассматривать в качестве универсального подхода к функционализации терапевтических ДНК и 2'-модифицированных РНК группировками различного типа действия, введенными посредством кислотолабильной фосфамидной связи.

#### **Литература**

1. Juliano R.L. The delivery of therapeutic oligonucleotides // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. P. 6518-6548.
2. Leriche G., Chisholm L., Wagner A. Cleavable linkers in chemical biology // Bioorg. Med. Chem. 2011. V. 20. P. 571-582.

## D-ЭНАНТИОМЕРНЫЙ ПЕПТИД, РАЗРАБОТАННЫЙ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, ДИНАМИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С АМИЛОИДОГЕННЫМ УЧАСТКОМ МЕМБРАНОСВЯЗАННОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ $\beta$ -АМИЛОИДА\*

П. К. Кузьмичев<sup>1</sup>, И. С. Охрименко<sup>1</sup>, П. Е. Вольнский<sup>2</sup>, Д. М. Лесовой<sup>1,2</sup>, Д. А. Корнилов<sup>1</sup>, Ю. А. Загрядская<sup>1</sup>, А. В. Камынина<sup>1,2</sup>, А. С. Арсеньев<sup>1,2</sup>, Р. Г. Ефремов<sup>1,2</sup>, Э. В. Бочаров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

✉ bon@nmr.ru

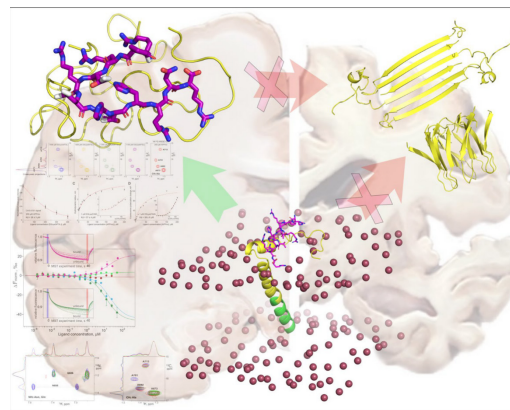
### Аннотация

D-энантиомерный пептид D3 был разработан для разрушения токсических агрегатов  $\beta$ -амилоида при терапии болезни Альцгеймера. Мы демонстрируем, что пептид D3 взаимодействует с амилоидогенным участком мембраносвязанного фрагмента белка-предшественника  $\beta$ -амилоида, ограничивая конформационное разнообразие и предотвращая образование межмолекулярных водородных связей и токсическую олигомеризацию.

Болезнь Альцгеймера — разрушительное нейродегенеративное заболевание, приводящее к тяжелой деменции. Детальная информация о структуре, динамике и различных межмолекулярных взаимодействиях биомолекул, непосредственно участвующих в развитии болезни Альцгеймера, необходима для рациональной разработки новых биологически активных соединений и скрининга существующих с целью получения наиболее эффективных кандидатов в лекарственные средства.

D-энантиомерный пептид D3 и его производные недавно были отобраны с помощью фагового дисплея для прямого разрушения агрегатов нейротоксического амилоидного пептида- $\beta$  ( $A\beta$ ), являющегося продуктом последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP). В настоящее время одно из D3-подобных соединений проходит фазу II клинических испытаний, однако молекулярные детали его профилактического или фармакологического действия с высоким разрешением не совсем ясны.

Для решения проблемы мы использовали комплексный подход, основанный на биохимических и биофизических методах, таких как белковая инженерия, микроскопический термфорез, спектроскопия ЯМР высокого разрешения и молекулярное моделирование [1]. Мы показали (рис.), что пептид D3, будучи внутренне неупорядоченным белком (IDP), может динамически и специфически взаимодействовать IDP/IDP-подобным образом с мембраносвязанным предшественником  $A\beta$ , трансмембранным фрагментом APP<sub>672-726</sub> ( $A\beta_{1-55}$ ), являющимся субстратом  $\gamma$ -секретазы. Также было протестировано влияние ряда патогенных семейных мутаций болезни Альцгеймера, локализованных в различных структурных и функциональных частях APP, на связывание пептида D3. Полученные данные свидетельствуют о том, что пептид D3 напрямую распознает амилоидогенный примембранный участок APP ( $A\beta_{17-26}$ ), ограничивая его конформационное разнообразие, сохраняя  $\alpha$ -спиральность и предотвращая образование межмолекулярных водородных связей. Это позволяет ингибировать ранние стадии превращения  $A\beta$  в  $\beta$ -конформацию характерную для малых токсичных  $A\beta$ -олигомеров. Достигнутый прогресс в понимании молекулярного механизма действия D3-подобных пептидов является важным шагом на пути к разработке эффективной стратегии лечения и профилактики болезни Альцгеймера.



Схематическое изображение на основе экспериментальных структурных данных действия D3-пептида (показан фиолетовым цветом) на мембраносвязанный пептид APP<sub>672-726</sub> ( $A\beta_{1-55}$ ) (в нижней центральной части рисунка) с последующим образованием комплекса D3/ $A\beta$  (в верхней левой части рисунка) и ингибирование образования токсичных олигомеров  $A\beta$  (в верхней правой части рисунка)

### Литература

1. Bocharov E.V. et al. All-d-Enantiomeric Peptide D3 Designed for Alzheimer's Disease Treatment Dynamically Interacts with Membrane-Bound Amyloid- $\beta$  Precursors // Journal of Medicinal Chemistry. 2021. V. 6416464-16479.

\* Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-64-46027).

© П. К. Кузьмичев, И. С. Охрименко, П. Е. Вольнский, Д. М. Лесовой, Д. А. Корнилов, Ю. А. Загрядская, А. В. Камынина, А. С. Арсеньев, Р. Г. Ефремов, Э. В. Бочаров, 2022

## DETECTION OF NUCLEIC ACID BASED CANCER MARKERS INSIDE THE CELL

A. V. Kulikova<sup>1</sup>, A. A. Eldeeb<sup>1</sup>, C. Patra<sup>1</sup>, D. M. Kolpashchikov<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Robotics and Biosensor Materials, SCAMT Institute, ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Chemistry Department, University of Central Florida, Florida, USA

<sup>3</sup>Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Florida, USA

<sup>4</sup>National Centre for Forensic Science, University of Central Florida, Florida, USA

✉ kulikova@scamt-itmo.ru

### Abstract

One of the most promising medicine areas is nucleic acid-based gene therapy. This technology can be used likewise for the cancer treatment, as it avoids problems with invasiveness and side effects of existing therapy methods. The aim of this study is to develop a system for detecting the location and availability of cancer marker molecules for DNA nanomachine based on antisense oligonucleotides for cancer therapy by selective degradation of the housekeeping gene RNAs.

Antisense oligonucleotides (ASOs) are short, synthetic, single-stranded oligodeoxynucleotides that can alter RNA and reduce, restore, or modify protein expression through several distinct mechanisms. ASOs are complementary to the target RNA sequence and form a DNA-RNA heteroduplex. Such heteroduplexes are recognized by the enzyme RNase H, which degrades the target RNA [1], our research is based on developing onco-marker dependent system for cancer treatment [2].

One of the most important tasks for the successful implementation of the project is the selection of specific cancer markers. The selected markers should be consistently overexpressed in cancer cells, compared with healthy ones. Cancer markers were selected using literature sources and databases such as DepMap, OGEE and miRBase. As a result, 3 cancer markers were selected for the study: KRAS (is a proto-oncogene; somatic mutations of the KRAS gene are often found in many types of cancer, including leukemia, colon cancer, lung cancer and others), ERBB2 (normally the human epidermal growth factor receptor 2 is a proto-oncogene; amplification or increased expression of this protein plays an important role in the progression of some types of breast cancer, ovaries and others) and microRNA 21 (high expression has been confirmed for many types of cancer, including lung, breast, blood and other). RT-qPCR was used to evaluate the expression of cancer markers in various cell lines (K562, SKOV-3 and HCT116). Preliminary results are presented in Figure 1. The results show that the expression of all markers in SKOV-3 cell line is higher than in other lines. In the future, the expression of these markers for cancer and the respective healthy cells will be compared.

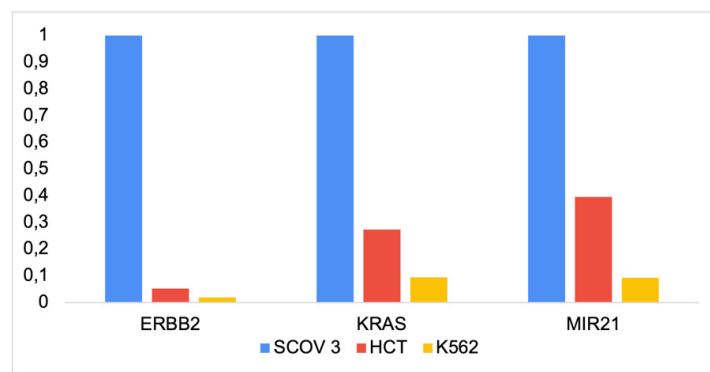


Fig. 1. Normalization of RT-qPCR results was based on the HSP90 housekeeping gene. Expression was calculated by raising 2 to the power of normalized results. The X-axis is the name of the sample. Each cell line has a color defined. Y-axis — expression level, %

For further development of the project and conducting experiments in cells, it is important to detect the localization of cancer marker molecules in cells, thereby establishing their availability for DNA nanomachines. These can be implemented in several variants: 1) light-up aptamers; 2) molecular beacons or 3) binary ASO. The latter option is the aforementioned DNA structure consisting of two parts. In the presence of the cancer marker of interest, this biASO will

cleave the molecule of the fluorescent substrate. In the uncut state, fluorescence is blocked by a quencher (Fig. 2 ). The next step of the tasks is to develop the system described above, test its operability *in vitro* and one of the most important tasks is to conduct experiments in the cell lines.

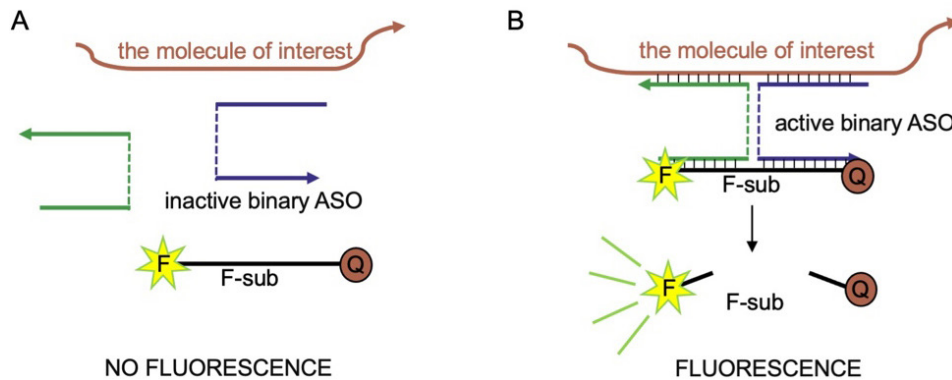


Fig. 2. Design of a detection system based on ASO. A — inactive state; B — active state

In conclusion, the approach proposed here may be a useful solution to existing problems with selectivity and side effects of therapeutic nucleic acids on living cells. Selection of specific cancer markers will assist the development of a universal therapeutic system. With the further development of these mechanisms and their work in cell cultures and *in vivo*, in the future, a new cancer treatment method based on the achievements of gene therapy may appear.

### References

1. Kolpashchikov D.M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // Acc. Chem. Res. American Chemical Society. 2019. Vol. 52. № 7. P. 1949–1956.
2. Oliveira A.G.G., et al. RNA-Cleaving DNA Thresholder Controlled by Concentrations of miRNA Cancer Marker // ChemBioChem. 2021. Vol. n/a. № n/a.

## РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ ВИДА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУЛЕНТНЫМ БАКТЕРИОФАГОМ СЕМЕЙСТВА *HERELLEVIROIDAE*\*

Н. С. Купцов, М. А. Корниенко, Д. А. Беспятых, Р. Б. Городничев,  
К. М. Климина, В. А. Веселовский, Е. А. Шитиков

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва

✉ kuptsovns@gmail.com

### Аннотация

В свете постоянно растущего числа бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, бактериофаги становятся актуальной альтернативой антибиотикам. В работе представлены результаты транскриптомного анализа *S. aureus* в ответ на инфекцию, вызванную терапевтическим бактериофагом семейства *Herelleviridae*, описаны изменения основных метаболических систем бактерии, показано увеличение экспрессии генов профагов и факторов вирулентности.

Увеличение числа бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, представляет на сегодняшний день серьезную угрозу здоровью человечества. Одной из альтернатив антимикробным препаратам могут выступать вирулентные бактериофаги. Фаговая терапия успешно зарекомендовала себя в борьбе с такими патогенами как устойчивые к метициллину изоляты *Staphylococcus aureus* [1]. Стафилофаги способны успешно лизировать до 80 % всех клинических изолятов *S. aureus* [2]. Однако для увеличения эффективности фаговой терапии необходимы фундаментальные знания о механизмах взаимодействия между фагами и бактериями. Одним из эффективных методов, позволяющих получить представление о фаговой инфекции на разных ее стадиях, является РНК-секвенирование. Ранее был определен транскриптомный профиль стафилофага vB\_SauM-515A1 семейства *Herelleviridae* [3]. Целью данной работы являлось исследование изменений экспрессии генов *S. aureus*, вызванных инфекцией вирулентным бактериофагом семейства *Herelleviridae*.

### Материалы и методы

Бактериофаг vB\_SauM-515A1 был выделен из терапевтического препарата «Бактериофаг стафилококковый» (АО НПО «Микроген») на штамме хозяине *S. aureus* SA515. Для отбора проб на транскриптомный анализ культуру инфицировали фагом в соотношении 10 к 1, пробы отбирали через 5, 15 и 30 мин. Секвенирование РНК проводили на платформе Illumina. Анализ дифференциальной экспрессии генов выполняли с помощью edgeR (FDR ≤ 0,01; fold change ≥ ).

### Результаты

Анализ транскриптомных данных обнаружил изменение экспрессии 263 генов при сравнении инфицированных и не инфицированных клеток. Наибольшие изменения были выявлены на 5 минуте фаговой инфекции (93↑, 83↓) по сравнению с 15 (47↑, 0↓) и 30 (82↑, 8↓) минутами. На ранней стадии основное количество дифференциально экспрессирующихся генов кодировали системы метаболизма нуклеотидов, аминокислот, а также системы предотвращения гибели клеток. На последующих стадиях инфекции гиперэкспрессированные гены относились к генам профагов (15 мин: n = 20; 30 мин: n = 28), что потенциально может быть связано с их индукцией. Кроме того, на поздней стадии была обнаружена повышенная экспрессия некоторых генов вирулентности (*hlgB*, *hlgC*, *set15*, *efb*, *esxA*, *essA*, *sbi*, *scn*), что накладывает дополнительные требования на методы очистки фагов, потенциально применимых в терапии.

### Выводы

Полученные результаты могут обеспечить лучшее понимание фундаментальных принципов взаимодействия между вирулентными стафилофагами и их хозяевами, а также заложить основу для безопасного и рационального использования вирулентных бактериофагов в терапевтических целях.

### Литература

1. Gupta, R., et al. Efficacy of Polyvalent Bacteriophage P-27/HP to Control Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Human Infections // *Curr Microbiol* 2011. V 62. P. 255–260.
2. Leskinen K, Tuomala H, Wicklund A, Horsma-Heikkinen J, Kuusela P, Skurnik M, Kiljunen S. Characterization of vB\_SauM-fRuSau02, a Twort-Like Bacteriophage Isolated from a Therapeutic Phage Cocktail // *Viruses*. 2017. V 9. P. 258.
3. Kornienko M, et al. Transcriptional Landscape of *Staphylococcus aureus* Kayvirus Bacteriophage vB\_SauM-515A1 // *Viruses*. 2020. V12 P. 1320.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.  
© Н. С. Купцов, М. А. Корниенко, Д. А. Беспятых, Р. Б. Городничев, К. М. Климина, В. А. Веселовский, Е. А. Шитиков, 2022

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНИЦИИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ МАТРИЧНОЙ РНК\***А. О. Курочкина<sup>2</sup>, Н. М. Шепелев<sup>1</sup>, М. П. Рубцова<sup>2</sup>, О. А. Донцова<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

✉ arina.kurochkina.2001@gmail.com

**Аннотация**

Более чем половина транскриптов человека содержит минимум один участок с малой открытой рамкой считывания длиной менее 100 кодонов в 5'-нетранслируемой области [1]. Малые открытые рамки считывания (upstream Open Reading Frames, uORF) способны влиять на трансляцию основной рамки считывания, а также выступать в роли матриц для синтеза малых функциональных белков, которые впоследствии могут участвовать в регуляции жизненно важных процессов [2]. В настоящей работе мы разработали различные векторные плазмиды для дальнейшего изучения влияния uORF на трансляцию основной рамки считывания.

Для анализа 5'-нетранслируемой области отобранных генов человека нами были созданы три генетические конструкции. Первая была производным от репортерной плазмиды, содержащей ген люциферазы светлячка, где вирусный промотор был заменен на эукариотический (EF-1 alpha short, EFS), что позволило снизить уровень экспрессии для лучшей оценки результатов трансфекции клеточных линий. Кроме того, EFS позволяет поддерживать стабильную экспрессию в клеточных линиях различного происхождения, в отличие от вирусного. Такая конструкция при встраивании в неё участка исследуемой 5'-нетранслируемой области перед репортерным геном сможет дать информацию о влиянии uORF на трансляцию основной открытой рамки считывания, путем внесения мутаций в различные участки uORF. Однако точность результатов может снижаться из-за различной эффективности трансфекции и последующей пробоподготовки.

Для исключения этих факторов была создана вторая плазида, в которую был добавлен ген люциферазы кораллового полипа под отдельным промотором. Таким образом, первая люцифераза дает информацию о влиянии малой открытой рамки считывания на трансляцию, а вторая служит внутренним контролем.

Чтобы добиться условий максимально приближенных к тем, которые существуют в генах человека, в третьей конструкции ген бета-субъединицы гемоглобина человека соединен с геном люциферазы светлячка. Данный ген содержит три экзона и два интрона. Данный вектор позволит проверить влияние uORF на нонсенс-опосредованный распад мРНК, который невозможен без наличия интронов в экспрессируемом гене. Таким образом, разработанные конструкции помогут определить функциональную значимость uORF в регуляции трансляции основной рамки считывания. Кроме того, созданные вектора позволяют оценить влияние других элементов 5'-нетранслируемой области на эффективность трансляции, например, структурных частей мРНК распознаваемых РНК-связывающими белками.

**Литература**

1. Johnstone, T. G., Bazzini, A. A. and Giraldez, A. J. (2016) 'Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates', *The EMBO Journal*, 35(7), pp. 706–723. doi: 10.15252/embj.201592759.
2. Makarewich, C. A. and Olson, E. N. (2017) 'Mining for Micropeptides', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2017.04.006.

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00006).  
© А. О. Курочкина, Н. М. Шепелев, М. П. Рубцова, О. А. Донцова, 2022

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТРИКСНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВ

Д. В. Ланских<sup>1</sup>, А. С. Белоусов<sup>1</sup>, А. В. Гринченко<sup>1,2</sup>, Н. А. Швед<sup>1,2</sup>, В. В. Кумейко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт наук о жизни ДВФУ, Владивосток

<sup>2</sup>Национальный научный центр морской биологии имени А. В. Жирмунского, ДВО РАН, Владивосток

✉ lanskikh.dv@dvfu.ru

### Аннотация

Функциональное восстановление повреждений нервной системы, вызванных травмами, онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями, является целью многих современных биомедицинских исследований. Одним из перспективных подходов является разработка биосовместимых тканеинженерных конструкций, которые позволят восполнить дефект ткани, выступая в роли каркаса, стимулирующего регенерацию.

Патологии нервной системы широко распространены и приводят к инвалидизации и смерти пациентов. Процессы регенерации нервной ткани в силу физиологических особенностей затруднены, а существующие терапевтические подходы малоэффективны. Вариантом решения данной проблемы может стать разработка биополимерных конструкций, ускоряющих процессы восстановления функциональной активности поврежденной области или выступающих в качестве носителя для адресной доставки различных лекарственных препаратов или биологически активных веществ в патологический очаг.

Исследовательской группой Лаборатории биомедицинских клеточных технологий Института наук о жизни ДВФУ совместно с сотрудниками ННЦМБ ДВО РАН ведется разработка биосовместимых материалов на основе модифицированных пектинов. Пектины являются полисахаридами на основе уроновых кислот и их производных, входящими в состав клеточной стенки высших растений, схожими по структуре с углеводными компонентами внеклеточного матрикса животных. Важно отметить, что внеклеточный матрикс нервной ткани в норме отличается высоким содержанием углеводных компонентов на основе полиуроновых кислот. Гидрогели, на основе пектинов, способны имитировать внеклеточный матрикс нервной системы человека и животных, не оказывая при этом токсичного или иммуногенного влияния.

Целью данного исследования стала оценка влияния композитных гидрогелей на основе модифицированных пектинов с добавлением коллагенов на свойства нервных стволовых клеток и клеток глиобластомы.

В качестве объекта исследования использовали нервные стволовые клетки, полученные из коры больших полушарий 15-дневных эмбрионов крыс, а также клетки модельной клеточной линии глиобластомы человека U87MG, которые культивировали в форме сфероидов в толще композитных гидрогелей в течение 10 дней.

В течение срока культивирования измеряли степень инвазии клеток в гель. После 10 дней осуществляли витальную окраску клеток флуоресцентными красителями для визуализации клеток и оценки жизнеспособности.

Для анализа дифференциальной экспрессии генов использовали данные, полученные после секвенирования транскриптома стволовых нервных клеток крысы, культивированных на гидрогелях из пектинов и композитных гидрогелях с добавлением коллагенов.

Результаты позволяют утверждать, что исследуемые материалы на основе низкоэтерифицированных пектинов с добавлением препаратов коллагена оказывают влияние на поведение культур нервных стволовых клеток и клеток глиобластомы человека: стимулируют рост отростков и миграцию при этом степень инвазии наиболее высока при концентрациях 500 и 1000 мкг/мл для коллагена и 1,0 % для пектина. Увеличение концентрации коллагена до 1500 мкг/мл практически не поддерживает инвазию клеток глиобластомы, однако обеспечивает миграцию нервных стволовых клеток. Кроме того, материалы поддерживают высокую жизнеспособность клеток в диапазоне от 71 до 97 % для глиобластомы U87MG и от 68 % до 90 % для нервных стволовых клеток в зависимости от состава материала.

Материалы на основе пектинов способствуют активации экспрессии генов, регулирующих дифференцировку глиальных клеток в сторону олигодендроцитов; изменению метаболического профиля клеток — активации генов, связанных с синтезом белка и процессами гликолиза, а также различными процессами, запускаемыми клеткой в ответ на гипоксию. Введение в состав пектиновых гидрогелей препаратов коллагена обеспечивает активацию экспрессии генов, связанных с организацией цитоскелета и миграцией, ростом нейритов, дифференцированной и морфогенезом.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования данных матриксных материалов в качестве основы для биоинженерных конструкций с целью решения проблем регенеративной медицины и тканевой биоинженерии мозга.



**ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ\***И. В. Ларионова<sup>1,2</sup>, П. С. Ямщиков<sup>1,2</sup>, М. А. Ракина<sup>1</sup>, Е. О. Казакова<sup>1</sup>, А. Б. Виллерт<sup>2</sup>, Л. А. Коломиец<sup>2</sup><sup>1</sup>Томский государственный университет<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт онкологии,

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

✉ larionova0903irina@mail.ru

**Аннотация**

Актуальным при раке яичников является выявление молекулярных особенностей клеток самой опухоли и клеток опухолевого микроокружения, характеристика их взаимодействий с химиотерапией и влияния такого взаимодействия на течение и исход заболевания. В работе впервые применена технология 10x Visium для сравнительного анализа пространственного транскриптома опухоли яичников у пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом.

Рак яичников (РЯ) является одним из наиболее распространенных гинекологических онкологических заболеваний с наихудшим прогнозом и самой высокой смертностью. Несмотря на хороший ответ на первую линию стандартной неoadъювантной химиотерапии (НАХТ), рецидивы у больных спорадическим раком яичников выявляются в короткие сроки в 70 % случаев. Наиболее актуальной задачей является выявление ключевых особенностей опухолевой ткани пациентов, не ответивших на НАХТ, и пациентов с развившимся неблагоприятным исходом (рецидивы, метастазы).

Мы применили технологию 10x Visium для пространственного транскриптомного анализа FFPE образцов опухолевой ткани яичников. В исследование было включено всего 16 пациенток. Из них 8 пациенток получали НАХТ: у пяти был неблагоприятный исход (местный или отдаленный рецидив или метастазирование) и у трех не было прогрессирования в течение 2 лет после лечения. У всех пациенток был первоначальный частичный ответ после завершения курса НАХТ, который оценивали по шкале Chemotherapy response score (CRS). Остальные 8 пациенток не получали НАХТ, среди них у четырех появился неблагоприятный исход, у четырех не было прогрессирования в течение 2 лет после лечения. Секвенирование библиотек 10x Visium проводили с использованием платформы NextSeq2000 (Illumina). Spaceranger использовался для анализа необработанных данных секвенирования, а именно для создания файлов Fastq, контроля качества необработанных прочтений, картирования прочтений и подсчета прочтений, сопоставленных с отдельными генами. Отфильтрованные матрицы экспрессии анализировали с помощью пакета Seurat в R. Отфильтрованные данные нормализовали с помощью SCTransform, объединяли и дополнительно ренормализовывали с помощью SCTransform. Пакет Harmony R использовался для уменьшения batch эффекта. Batch-скорректированные данные использовались для нелинейного уменьшения размерности и кластеризации SNN.

Мы впервые провели пространственный транскриптомный анализ пациентов с раком яичников, получавших НАХТ и имеющих два различных исхода: благоприятный и неблагоприятный. Биоинформатический анализ позволил выявить специфические кластеры в разных группах. У пациентов с неблагоприятным исходом в стромальных компартментах обнаруживались кластеры со значительно более выраженной экспрессией генов, относящихся к процессам ангиогенеза, ремоделирования внеклеточного матрикса, инвазии и иммунной активации. Они включают гены, кодирующие коллагены, матриксные металлопротеазы и другие белки матрикса, а также иммуноглобулины.

\* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10021, и при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

© И. В. Ларионова, П. С. Ямщиков, М. А. Ракина, Е. О. Казакова, А. Б. Виллерт, Л. А. Коломиец, 2022

## ЭФФЕКТ ЦЕНТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА (BDNF) НА ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ С АУТИСТИЧЕСКИ-ПОДОБНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ\*

М. А. Липницкая, А. С. Цыбко

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

✉ m.lipnitskaya@g.nsu.ru

### Аннотация

Центральное введение белка BDNF мышам с аутистически-подобным поведением приводит к изменению экспрессии генов, участвующих в рецепции и метаболизме дофамина. Однако однократной внутрижелудочковой инъекции BDNF недостаточно для нормализации поведения животных.

Расстройства аутистического спектра (РАС) являются одними из наиболее распространенных нейроонтогенетических расстройств. Однако этиология расстройств до сих пор не до конца ясна.

Существует предположение, что в основе патофизиологических особенностей РАС лежат нарушения синаптической пластичности, которые характеризуются изменением степени связанности синапсов и их количества. Ключевым элементом синаптической пластичности является нейротрофический фактор мозга BDNF. Имеются прямые и косвенные данные об изменении уровня BDNF у пациентов с РАС.

С другой стороны, имеет место дофаминовая гипотеза, объясняющая нарушения в поведении, характерные для РАС. Согласно этой концепции, дисфункция мезокортиколимбического пути дофамина приводит к социальному дефициту, а абerrации в нигростриарном пути обуславливают развитие стереотипии.

Известно, что BDNF и дофаминергическая (ДА) система тесно связаны. BDNF активно экспрессируется в областях, которые как продуцируют (компактная часть черной субстанции и вентральная тегментальная область среднего мозга), так и получают дофамин (стриатум, префронтальная кора). BDNF стимулирует синтез и высвобождение дофамина, а также является важным нейропротектором ДА системы. Тем не менее, на данный момент достаточно мало исследований как самой ДА системы, так и BDNF и их взаимодействия в контексте РАС.

Исследование взаимодействия BDNF и ДА системы проводилось нами на мышах линии BTBR, которые не только проявляют аутистически-подобное поведение, но и демонстрируют большинство других патофизиологических особенностей, характерных для пациентов с РАС. В частности, у них наблюдаются нарушения в ДА системе, а также дефицит BDNF и его рецептора TrkB в гиппокампе и фронтальной коре.

Животным была сделана однократная инъекция рекомбинантного белка BDNF в дозе 300 нг в левый боковой желудочек мозга. Через 7 дней было проведено исследование поведения. После серии поведенческих тестов животные были подвергнуты эвтаназии, затем извлекались образцы среднего мозга, стриатума, фронтальной коры и гиппокампа. Для оценки уровня мРНК BDNF и его рецепторов (TrkB и p75<sup>NTR</sup>), а также ключевых генов ДА системы (тирозингидроксилазы (TH), дофаминового транспортера (DAT), фермента метаболизма дофамина COMT и дофаминовых рецепторов D1 и D2 типов (DRD1 и DRD2, соответственно)) в образцах головного мозга, использовался метод ОТ-ПЦР в реальном времени.

Кратковременное увеличение уровня BDNF в головном мозге мышей незначительно усилило стереотипное поведение, не оказав влияния на исследовательскую активность, неophobia, тревожное и социальное поведение у мышей BTBR.

Центральное введение BDNF мышам BTBR достоверно увеличило экспрессию гена, кодирующего TrkB, в среднем мозге, и гена, кодирующего DRD1, во фронтальной коре. В то же время, выявлено значительное снижение уровня мРНК COMT в гиппокампе и фронтальной коре, а также в среднем мозге на уровне тенденции, у животных опытной группы.

Не было обнаружено влияния однократной внутрижелудочковой инъекции BDNF на уровни мРНК BDNF, TrkB и p75<sup>NTR</sup> в гиппокампе, стриатуме и во фронтальной коре, а также BDNF и p75<sup>NTR</sup> в среднем мозге. Также не выявлено изменений экспрессии DRD1 и DRD2 в гиппокампе, среднем мозге и стриатуме, а также экспрессии DRD2 во фронтальной коре у животных, получивших инъекцию BDNF. Уровни мРНК TH и DAT в среднем мозге и COMT в стриатуме не изменялись у животных опытной группы.

Таким образом, впервые было осуществлено внутрижелудочковое введение BDNF мышам линии BTBR, которое показало, что на фоне существенного дефицита BDNF в мозге данных животных, однократной инъек-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант №22-15-00028.

---

ции нейротрофического фактора недостаточно для коррекции патологического поведения мышей ВТВР. В то же время, впервые было показано, что центральное введение BDNF изменяет транскрипцию генов, кодирующих DRD1 и COMT, вовлеченных в рецепцию и метаболизм дофамина. Это является первым подтверждением того, что BDNF осуществляет модуляцию ДА системы у животных с аутистически-подобным поведением, что можно рассматривать в качестве новой мишени для терапии РАС.

## ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ МРНК, КОДИРУЮЩИХ GFP, ЗА СЧЕТ ВКЛЮЧЕНИЯ В ИХ СОСТАВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ И ОПТИМИЗАЦИИ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЕЙ\*

В. Р. Литвинова<sup>1</sup>, А. П. Рудомётов<sup>1</sup>, С. В. Шарабрин<sup>1</sup>,  
Н. Б. Рудомётова<sup>1</sup>, Д. С. Новопашина<sup>2</sup>, Л. И. Карпенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ viktoriya\_litvinova\_1999@mail.ru

### Аннотация

Вакцины на основе мРНК имеют ряд преимуществ перед другими типами вакцин, что делает их удобной платформой для разработки средств профилактики инфекционных заболеваний. Ключевыми этапами в разработке мРНК-вакцин являются повышение стабильности мРНК и эффективности ее доставки в клетки-мишени. В данной работе было изучено влияние химически модифицированных нуклеотидов и нетранслируемых областей в составе мРНК, кодирующей GFP, на эффективность ее трансляции. С помощью олигонуклеотидных зондов с флуоресцентной меткой разработана методика анализа проникновения мРНК в клетки при использовании разных способов доставки.

Вакцинация является наиболее эффективным методом предотвращения инфекционных заболеваний. Один из новых подходов — это вакцины на основе мРНК. Они имеют ряд преимуществ по сравнению с другими типами вакцин: иммунизация мРНК индуцирует гуморальный и клеточный иммунные ответы, но не вызывает антивекторного иммунного ответа; период полужизни мРНК *in vivo* можно регулировать с помощью различных модификаций и способов доставки. Производство мРНК-вакцин при развитой инфраструктуре — это быстрое, масштабируемое и однотипное производство.

В настоящее время ведутся работы по совершенствованию технологии мРНК-вакцин в плане повышения стабильности мРНК, эффективности экспрессии целевого гена и способов доставки.

Целью данной работы было исследование влияния включения в состав мРНК химически модифицированных нуклеотидов и оптимизации нетранслируемых областей на эффективность трансляции мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP).

На первом этапе работы оценивали влияние нуклеотидного состава синтезируемой мРНК на уровень синтеза белка GFP в клетках HEK293. Для этого в ходе синтеза РНК в реакционную смесь рибонуклеозидтрифосфатов вносили либо уридин, либо его аналоги. Первая смесь содержала уридин, вторая и третья — псевдоуридин и N1-метилпсевдоуридин соответственно. Так, были получены 3 варианта мРНК с разным нуклеотидным составом: с уридином, с псевдоуридином и с N1-метилпсевдоуридином. После этого была проведена оценка эффективности трансляции полученных мРНК путем трансфекции эукариотических клеток и последующего анализа интенсивности свечения белка GFP. Было показано, что наиболее эффективную трансляцию обеспечивает мРНК со 100 % заменой уридина на N1-метилпсевдоуридин.

Целью второго этапа работы являлся выбор нетранслируемых областей, обеспечивающих эффективную трансляцию целевой мРНК. Для получения ДНК-матриц, используемых для синтеза мРНК, были использованы 3 плазмиды (Cassette), содержащие нетранслируемые области из высокоэкспрессируемых и стабильных мРНК известных генов, а именно — последовательности нетранслируемых областей генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобина человека и гена альфа-цепи цитохрома b-245 (CYBA). В составе трех ДНК-конструкций был клонирован ген GFP, далее проведен ферментативный синтез соответствующих мРНК с данных матриц и анализ эффективности их трансляции, как описано выше. Было установлено, что наиболее эффективную трансляцию обеспечивает мРНК, полученная с использованием ДНК-конструкции Cassette3, содержащей последовательности гена  $\beta$ -глобина человека.

Заключительный этап работы был посвящён разработке удобной модели для изучения эффективности доставки мРНК в клетки. Выбранный нами подход заключался в мечении РНК зондами с флуоресцентной меткой. В ходе работы были синтезированы короткие нуклеотидные последовательности (зонды), комплементарные участкам целевой РНК. Далее к зондам была присоединена флуоресцентная метка карбоксифлуоресцеина и проведена характеристика полученных олигонуклеотидов с помощью хроматографии, спектрофотометрии и масс-спектрометрии. Для подтверждения работоспособности модели проводили трансфекцию клеток HEK293 комплексом РНК с зондами в составе Lipofectamine Messenger Max и анализировали клетки с помощью проточной цитофлуориметрии. Было показано, что данную методику можно использовать для изучения эффективности проникновения РНК в клетки в комплексе с различными компонентами доставки.

\* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© В. Р. Литвинова, А. П. Рудомётов, С. В. Шарабрин, Н. Б. Рудомётова, Д. С. Новопашина, Л. И. Карпенко, 2022

## ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОНИЕВЫХ СОЛЕЙ НА РЕГУЛЯЦИЮ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ

А. П. Любина, Н. В. Терехова, А. Д. Волошина, С. К. Амерханова, Д. А. Татаринов, В. Ф. Миронов

*Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова — обособленное структурное подразделение  
ФИЦ КазНЦ РАН, Казань*

✉ aplyubina@gmail.com

### Аннотация

По данным ВОЗ, рак остается одной из основных причин смерти во всем мире, поэтому остается актуальным создание новых эффективных и безопасных противоопухолевых агентов. Фосфониевые соли — это широко изучаемый класс фосфорорганических соединений, известные широким спектром биологической активности.

В работе были исследованы фосфониевые соли, обладающие антимикробной активностью, а также ранее проявившие селективность в отношении некоторых опухолевых клеточных линий человека [1,2]. При изучении механизма наблюдалось увеличение числа активных форм кислорода (АФК), снижение митохондриального мембранного потенциала, а также индукция как раннего, так и позднего апоптоза. Кроме того, методом проточной цитометрии была выявлена остановка клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, что также подтверждается результатами эксперимента в режиме реального времени.

Для более детального изучения процессов, происходящих в клетке под воздействием исследуемых фосфониевых солей, были проведен мультиплексный анализ семи маркеров апоптоза. Оказалось, что при воздействии фосфониевых солей, увеличивается количество белка p53, проапоптотического белка Bad и каспазы 9, что свидетельствует о протекании апоптоза по внутреннему пути в результате повреждения ДНК. Затем мультиплексный анализ семи маркеров повреждения ДНК и генотоксичности показал значительное превышение маркера p21, который, как известно, активируется белком p53 и затрудняет переход G<sub>1</sub>/S клеточного цикла. Маркер двуцепочечных разрывов ДНК H2AX также наблюдался в опытных образцах. Увеличение ATR киназы при воздействии веществ свидетельствует также и о негативном влиянии последних на репликацию ДНК.

Суммируя вышеописанное, можно заключить, что воздействие новых производных фосфониевых солей вызывает в опухолевой клетке окислительный стресс, который, как известно, приводит к повреждению ДНК. В ответ на эти повреждения, происходит остановка клеточного цикла, а затем запускается апоптоз по митохондриальному пути.

Таким образом, исследованные фосфониевые соли представляют интерес в качестве основы для создания потенциального противоопухолевого агента.

### Литература

1. Terekhova N. V., Lyubina A. P., Voloshina A. D., Sapunova A. S., Khayarov K. R., Islamov D. R., Usachev K.S., Evtugyn V.G., Tatarinov D.A., Mironov, V.F. Synthesis, biological evaluation and Structure-Activity Relationship of 2-(2-hydroxyaryl) alkenylphosphonium Salts with Potency as Anti-MRSA Agents // *Bioorganic Chemistry*. 2022. V. 127. P. 106030.
2. Terekhova N. V., Tatarinov D. A., Shaihtudinova Z. M., Pashirova T. N., Lyubina A. P., Voloshina A. D., Sapunova A.S., Zakharova L.Ya., Mironov, V.F. Design and synthesis of amphiphilic 2-hydroxybenzylphosphonium salts with antimicrobial and antitumor dual action // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020. V 30. P 127234.

## ПРОТОКОЛ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИДОФОСФАТОВ\*

Е. А. Малова, М. А. Баженов, И. А. Пышная

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

✉ malova.ev.an@gmail.com

### Аннотация

Предложен подход к получению олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих межнуклеотидные амидофосфатные связи. Метод основан на использовании реакции Штаудингера в рамках стандартного твёрдофазного амидофосфитного протокола синтеза олигонуклеотидов.

В последние десятилетия большое внимание направлено на разработку электронейтральных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов (ON). Модифицированные нуклеиновые кислоты такого типа находят, как правило, применение в антисмысловой терапии и молекулярной диагностике. Основными ограничениями для широкого применения модифицированных ON являются сложность синтеза и его ресурсозатратность. В связи с этим актуальной задачей является поиск подходов к синтезу аналогов нуклеиновых кислот в рамках стандартного амидофосфитного метода получения олигонуклеотидов.

Перспективным представителем электронейтральных ON можно назвать нуклеиновые кислоты, содержащие в своём составе амидофосфатные (PNH<sub>2</sub>) связи, ввиду небольшого размера NH<sub>2</sub>-группы и благоприятных характеристик растворимости. В настоящее время опубликованы два способа получения PNH<sub>2</sub>-содержащих олигонуклеотидов, один из них основан на комбинированном использовании Н-фосфонатного и амидофосфитного методов синтеза [1], второй — на использовании йод-активированного замещения в боранфосфонатных олигонуклеотидах [2]. В данной работе предложен подход к получению PNH<sub>2</sub>-содержащих олигонуклеотидов в рамках стандартного амидофосфитного синтеза нуклеиновых кислот.

С этой целью в качестве альтернативного окислителя P(III)→P(V) по реакции Штаудингера в рамках стандартного автоматического синтеза был выбран 9-флуоренилметилоксикарбонилазид (FmocN<sub>3</sub>), поскольку данная реакция протекает с приемлемой для синтетического протокола скоростью. Оптимизированы условия синтеза гомо- и гетероолигонуклеотидов, содержащих от 1 до 3 PNH<sub>2</sub>-модификаций в разных положениях олигонуклеотидной цепи, с выходом от 32 до 70 % (см. рисунок).

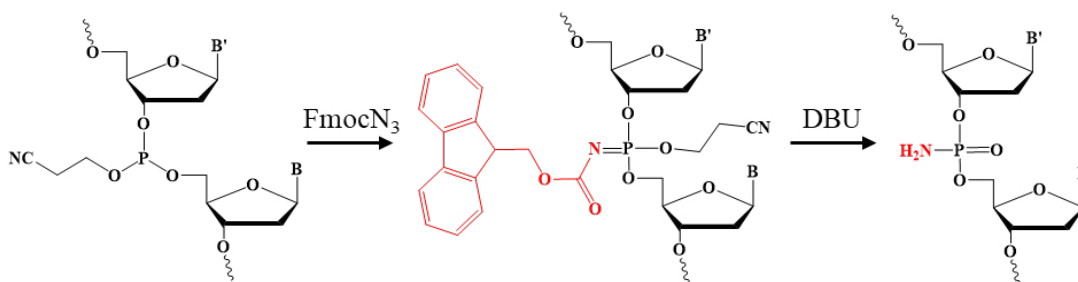


Схема введения PNH<sub>2</sub>-модификаций в состав олигонуклеотидной цепи

Продемонстрировано, что введение одной амидофосфатной модификации в состав олигонуклеотида снижает температуру плавления его комплекса с ДНК-матрицей в среднем на 1,1°C (1 М NaCl, 100 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2). Снижение ионной силы буферного раствора приводит к менее выраженному изменению температуры плавления с тенденцией в сторону стабилизации ДНК/ДНК-комплексов.

Таким образом, в рамках исследования оптимизированы условия синтеза амидофосфатных (PNH<sub>2</sub>) олигонуклеотидов с использованием стандартного амидофосфитного протокола получения нуклеиновых кислот.

### Литература

1. Peyrottes, S. Oligodeoxynucleoside phosphoramidates (P-NH<sub>2</sub>): synthesis and thermal stability of duplexes with DNA and RNA targets // *Nucleic Acids Res.* — 1996. — Vol. 24. — N. 10. — P. 1841–1848.
2. Paul, S., Roy, S., Monfregola, L., Shang, S., Shoemaker, R., Caruthers, M. H. Oxidative Substitution of Boranephosphonate Diesters as a Route to Post-synthetically Modified DNA // *J. Am. Chem. Soc.* — 2015. — Vol. 137. — N. 9. — P. 3253–3264.

\* Исследования выполнены при поддержке государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1.  
© Е. А. Малова, М. А. Баженов, И. А. Пышная, 2022

**RNA-RECOGNITION MOTIF OF FUSED IN SARCOMA (FUS) IS INVOLVED IN THE REGULATION OF PARP1 ACTIVITY AND REVEALS SPECIFIC INTERACTION WITH POLY(ADP-RIBOSE)\***E. M. Mamontova<sup>1-3</sup>, M. J. Clément<sup>2</sup>, M. V. Sukhanova<sup>1</sup>, V. Joshi<sup>2</sup>, O. I. Lavrik<sup>1,3</sup>, D. Pastré<sup>2</sup><sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*<sup>2</sup>*SABNP, University of Evry, INSERM U1204, University Paris-Saclay, Evry, France*<sup>3</sup>*Novosibirsk State University*✉ [evgeniya.mamontova@univ-evry.fr](mailto:evgeniya.mamontova@univ-evry.fr)**Abstract**

In the present study we showed that FUS, an RNA-binding protein, binds specifically to PAR through its RRM domain leading to an amplification of PAR synthesis by PARP-1. We identified specific residues located in the FUS RRM which can be PARylated by PARP-1 to control the level of PARylation and proposed a model in which, following transcriptional arrest that releases FUS from nascent mRNA, FUS can be recruited by PARP-1 in the presence of DNA damage to amplify PARylation.

One of the earliest cellular responses to genotoxic stress is the recognition of DNA damage sites by ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like family members such as PARP-1 and the synthesis of long and branched poly(ADP-ribose) (PAR) chains covalently attached to PARP1 itself or to other acceptor proteins. The high occurrence of poly(ADP-ribosylation) (PARylation) among RNA-binding proteins (RBPs) and their accumulation at the sites of microlaser-induced DNA damage raise issues about the putative role of RBPs in DNA repair. Of particular interest is RBP FUS, which is one of the most enriched protein factors recruited to regions of DNA damage and one of the most highly PARylated nuclear proteins in oxidative stress [1]. Moreover, FUS is known to form membraneless compartments in both nucleus and cytoplasm [2].

Here we demonstrated that the transcription arrest induced by actinomycin D leads to FUS release from nascent mRNA and to its further recruitment by autoPARylated PARP-1 at the sites of DNA damage. Our results indicate that the interaction of FUS with PAR facilitates the formation of FUS-rich compartments and leads to an enhancement of overall PAR synthesis in HeLa cells. We suggested that FUS RNA-recognition motif (RRM) mediates the specific binding to PAR attached to PARP1. We identified specific amino acid residues located in RRM domain, which could affect FUS PARylation and the overall PAR synthesis in HeLa cells under oxidative stress. We found that FUS RRM can directly bind to PAR *in vitro* and the solution structure of RRM-PAR was determined by NMR spectroscopy. Our structural study indicate that this type of RRM-PAR interactions is most likely possible for other proteins of FET family, EWSR1 and TAF15, which have similar RRM organization.

**References**

1. Rulten S. et al. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage // *Nucleic Acids Research*. 2014. Vol. 42(1). P. 307–314.
2. Singatulina A. S. et al. PARP-1 Activation Directs FUS to DNA Damage Sites to Form PARG-Reversible Compartments Enriched in Damaged DNA // *Cell Reports*. 2019. Vol. 27(6). P. 1809–1821.

---

\* This study was supported by Russian Scientific Foundation (RSF 20-14-00086).

© E. M. Mamontova, M. J. Clément, M. V. Sukhanova, V. Joshi, O. I. Lavrik, D. Pastré, 2022

## ПОЛИМОРФИЗМ RS1050152 АССОЦИИРОВАН С СОСТАВОМ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА \*

М. И. Маркелова<sup>1</sup>, Д. Р. Хуснутдинова<sup>1</sup>, А. М. Сенина<sup>1</sup>, М. Н. Синягина<sup>1</sup>, Г. Ф. Шакирова<sup>2</sup>, С. Р. Абдулхаков<sup>1</sup>, И. В. Колесникова<sup>3</sup>, О. Ю. Шагалеева<sup>3</sup>, С. В. Лямина<sup>4</sup>, Н. Б. Захаржевская<sup>3</sup>, Т. В. Григорьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

<sup>2</sup>Городская поликлиника № 21, Казань

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства, Москва

<sup>4</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова

✉ mimarkelova@gmail.com

### Аннотация

В работе представлены результаты анализа микробиоты кишечника и определения полиморфизма rs1050152 в гене SLC22A4 для пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев, а также выявлена ассоциация данных параметров.

### Введение

Болезнь Крона (БК) — многофакторное рецидивирующее заболевание, характеризующееся воспалением стенки разных отделов желудочно-кишечного тракта. Считается, что БК обуславливается рядом взаимодействий между факторами окружающей среды, кишечной микробиотой и иммунными реакциями генетически предрасположенного хозяина. Известно, что микробиота кишечника пациентов с БК характеризуется специфическим дисбиозом, который выражается общим снижением разнообразия и увеличением доли условно-патогенных микроорганизмов. Также известно, что генотип хозяина играет роль в формировании стабильного микробного сообщества кишечника. Одним из генетических вариантов, ассоциированных с БК, является rs1050152 в гене SLC22A4. Данный ген кодирует белок-транспортер OСТN1, экспрессирующийся в различных тканях, в том числе и в кишечнике, субстратом для OСТN1 служат ацетилхолин, карнитин, триэтиламмоний, эрготионеин и др.

Целью данной работы явилось установление ассоциации варианта rs1050152 в гене SLC22A4 с изменениями состава микробиоты у пациентов с БК.

### Материалы и методы

Были собраны образцы кала и крови от 66 пациентов с БК и 25 здоровых добровольцев. Из образцов кала выделяли ДНК с последующим секвенированием ампликонов гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina, США). Определение генотипов варианта rs1050152 в гене SLC22A4 проводили методом MALDI-TOF минисеквенирования. Кластеризация (определение энтеротипов) образцов микробиоты производилась с помощью метода DMM (Dirichlet multinomial mixtures [1]). Для оценки различий частоты встречаемости аллелей использовался точный критерий Фишера.

### Результаты

Было выявлено, что в группе пациентов с БК достоверно чаще встречается аллель rs1050152<sup>T</sup> в гене SLC22A4 по сравнению с группой контроля (30,3 % и 4,0 %, соответственно, OR = 9,7; 95 % CI 2,8-66,1; p < 0,001).

Среди образцов кишечной микробиоты было выявлено 2 кластера-энтеротипа: все 25 образцов от здоровых добровольцев и 47 образцов от пациентов с БК составляют I кластер, тогда как остальные 19 образцов микробиоты пациентов с БК представляют кластер II. Второй кластер отличается сниженной представленностью семейств *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae* и *Ruminococcaceae*, тогда как доли *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* и *Enterococcaceae* были повышены по сравнению с первым кластером-энтеротипом. Таким образом, энтеротип II характеризуется дисбиозом.

В группе пациентов с БК, микробиота которых составляет II кластер, частота аллеля rs1050152<sup>T</sup> в гене SLC22A4 выше, чем среди пациентов с БК, микробиота которых относится к I кластеру (44,7 % и 24,5 %, соответственно, OR = 2,5; 95 % CI 1,1-5,5; p = 0,03).

\* Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (№ 0671-2020-0058).

© М. И. Маркелова, Д. Р. Хуснутдинова, А. М. Сенина, М. Н. Синягина, Г. Ф. Шакирова, С. Р. Абдулхаков, И. В. Колесникова, О. Ю. Шагалеева, С. В. Лямина, Н. Б. Захаржевская, Т. В. Григорьева, 2022



**Выводы**

Выявленные отличия частоты встречаемости БК-ассоциированного аллеля rs1050152<sup>T</sup> в гене SLC22A4 в зависимости от энтеротипа микробиоты кишечника пациентов с БК свидетельствуют о роли генотипа человека в формировании бактериального сообщества кишечника. Данный аллель ассоциирован с нарушенной функцией белка-транспортера ацетилхолина, который регулирует пролиферацию клеток, секрецию и перистальтику, а также воспаление стенки кишечника за счет высвобождения провоспалительных цитокинов предположительно в ответ на бактериальные продукты или компоненты клеточной стенки.

**Литература**

1. Holmes I., Harris K., Quince C. Dirichlet multinomial mixtures: generative models for microbial metagenomics // PloS one. 2012. V. 7. №. 2. P. E30126.

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОВ *NRAS*, *KRAS* И *BRAF* ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

А. А. Маслова<sup>1</sup>, Е. Л. Назарова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кировский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства

✉ nmaslova99@gmail.com

### Аннотация

Множественная миелома (ММ), несмотря на использование новых методик терапии, остается неизлечимой. Резистентность к лекарственным препаратам, прогрессирование и рецидив ММ связаны с мутациями, сопровождающими клональную эволюцию. Актуальным вопросом является то, какие субклональные мутации возникают / сохраняются / исчезают при прогрессировании и рецидиве ММ и как они могут влиять на течение заболевания.

### Введение

В настоящее время ММ определяется как злокачественное новообразование с клональной пролиферацией атипичных плазмочитов в костном мозге (реже в экстрамедуллярных очагах), синтезирующих моноклональные иммуноглобулины или легкие цепи [1, 2, 3].

Цитогенетическое исследование клеток костного мозга (КМ) у больных ММ является рутинным методом обследования, по результатам которого проводится стратификация больных на группы риска и стадирование ММ [2]. Чаще всего при цитогенетическом исследовании определяются транслокации 14 хромосомы с вовлечением локуса гена *IGH* (t(4;14), t(14;16), t(6;14), t(11;14)), трисомия ряда нечетных хромосом, del17p13, del13q и amp1q21. Однако цитогенетических аномалий недостаточно, чтобы полностью объяснить возникновение, прогрессирование и прогнозирование течения ММ [4, 5, 6].

**Целью** данного исследования является оценка влияния генов *NRAS*, *KRAS* и *BRAF* на прогноз ММ.

### Материалы и методы

Исследовалась ДНК, выделенная из клеток КМ 52 больных ММ, проходивших обследование и лечение в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с апреля 2020 г. по июнь 2022 г. Выделение ДНК проводилось с помощью набора реагентов «РИБО-преп» из клинического материала. Для анализа 7 мутаций (G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D) в гене *KRAS* и мутаций G12/13X, Q61X в гене *NRAS* методом ПЦР в режиме реального времени использовались наборы реагентов «БиоЛинк». Выявление мутации V600E в гене *BRAF* методом ПЦР в режиме реального времени проводилось с помощью набора реагентов ООО «Синтол».

### Результаты

из 52 образцов костного мозга больных ММ, в 7 (13,5 %) обнаружены мутации исследуемых генов: у 6 — в гене *NRAS* в 61 кодоне (11,5 %), у 1 — в гене *BRAF* (1,9 %). У пациента с мутацией в гене *BRAF* наблюдалась первично-рефрактерная форма заболевания при проведении терапии 1 линии по схеме VCD. Несмотря на терапию 2 линии KRD и трансплантацию аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, наблюдался ранний рецидив заболевания. У пациентов с мутацией в гене *NRAS* у двоих достигнут полный ответ на терапию 1 линии (VRD, VCD), у одного — очень хороший частичный ответ на терапию 1 линии по схеме VCD; у еще одного пациента обнаружена рефрактерность к леналидомиду. Ввиду присоединившейся новой коронавирусной инфекции у двоих больных с мутациями гена *NRAS* оценить течение ММ и эффективность лечения на данный момент невозможно. Среди пациентов с мутациями генов *NRAS* и *BRAF* примерно в половине наблюдений наблюдались неблагоприятные события (рефрактерность, рецидив), у остальных течение заболевания было стабильным.

### Литература

1. Катин, Н. А. Множественная миелома: сегодня и завтра / Н. А. Катин, Т. Е. Михайлова, А. В. Томчина // Медицинские новости. — 2018. — №6. — С. 17–26.
2. Менделеева, Л. П., Вотякова О. М., Рехтина И. Г. Множественная миелома // Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению злокачественных лимфопролиферативных заболеваний; под ред. И. В. Поддубной, В. Г. Савченко. Москва. — 2018. — 81 с.

---

3. Значение цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований при множественной миеломе / А. А. Сальник и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2017 г. — №16. — С. 69

4. A multiple myeloma-specific capture sequencing platform discovers novel translocations and frequent, risk-associated point mutations in IGLL5 / Brian S. White and others // Blood Cancer Journal. — 2018. — №8(3). — P. 35

5. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma / Brian A. Walker and others // Blood. — 2018. — №132(6). — P. 587-597.

6. Role of 1q21 in Multiple Myeloma: From Pathogenesis to Possible Therapeutic Targets / Jessica Burroughs Garcia and others // Cells. — 2021. — №10(6). — P.1360.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ (*MICROTUS ARVALIS*) ПО ФРАГМЕНТУ ГЕНА *cyt b* В БЕЛАРУСИ

Е. И. Машков, Е. С. Гайдученко

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь*

✉ mashkov.evgenii25@gmail.com

### Аннотация

В статье приведены оригинальные данные о генетической вариабельности гена *cyt b* обыкновенной полевки (*Microtus arvalis* s.l.) из 19 локалитетов исследования на территории Беларуси. Показано, что популяция вида в Беларуси характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия, сравнимым с таковым у других гаплогрупп Восточной мтДНК линии.

Недавние филогеографические исследования [1, 2, 3] позволили выявить шесть линий мтДНК обыкновенной полевки. Расселение обыкновенной полевки из Карпатского рефугиума (около 9000 тыс. лет назад) дало начало восточной линии, которая сейчас занимает центральную и восточную части Северной Европы, учитывая в настоящее время отсутствие каких-либо свидетельств позднеледниковых окаменелостей из других мест в этом регионе.

В связи с малым объемом исследованных проб из восточной части Европы, а также полным отсутствием образцов обыкновенной полевки из Беларуси, мы получили последовательности мтДНК *cyt b* из различных локалитетов Республики для определения генетического статуса данного вида.

Материалом для настоящей работы послужили данные, собранные на протяжении в 2018–2021 гг. с помощью живоловушек трапикового типа. В анализ включено 53 особи (представленные 41 гаплотипом), отловленных из 19 локалитетов исследования. Учет проводился по стандартной методике, методом ловушко-суток [4].

Последовательности содержали 46 полиморфных сайтов, 23 из которых были филогенетически информативными.

При анализе образцов обыкновенной полевки из Беларуси, была выявлена точка разделения двух отдельных линий (кластера), отходящих от более древних гаплотипов. Данное предположение подтверждается ранее проводимым исследованием [1, 5] о расселении Восточной линии обыкновенной полевки из Карпатского рефугиума, начало расширения которой проходило 8900 лет назад (95 % доверительный интервал = от 22 300 до 3900 лет до н. э.).

Описание показателей генетического разнообразия проведено для каждого генетически обособленного кластера обыкновенной полевки (табл.). Первая группа представлена особями, распространенными в центральной, западной и южной частях Беларуси. Во вторую группу вошли особи, обитающие на территории северной и восточной частей Беларуси.

В «белорусской» популяции максимальную изменчивость (среднее число нуклеотидных различий) можно отметить в северной и восточной линии ( $k = 4,23$ ). Максимальные дистанции также были выявлены для данной географически обособленной группы — 0,0065. Для западной и южной линий отмеченная нами изменчивость несколько ниже ( $k = 2,94$ ), также и показатель общей генетической дистанции — 0,0058.

### Данные генетического разнообразия *Microtus arvalis* по митохондриальному гену *cyt b* в Беларуси

<i>M. arvalis</i>	n	S	H	Hd±SD <sub>Hd</sub>	π±SD <sub>π</sub>	k	p	T's D
Западная и южная линии	38	31	27	0,943± 0,030	0,0043±0,0006	2,94	0,0058	-2,09
Северная и восточная линии	15	16	14	0,990± 0,028	0,0061±0,0006	4,23	0,0065	-0,56

Примечание. n — число последовательностей; S — число вариабельных сайтов; H — число гаплотипов; Hd — гаплотипическое разнообразие; π — нуклеотидное разнообразие; k — среднее число нуклеотидных различий; p — общая генетическая дистанция; SD — стандартное отклонение, T's — D тест Таджимы.

Отрицательный показатель Тест Таджимы (T's D = -2.09) (статистическая значимость подтверждена на уровне  $p \leq 0.05$ ), у первой линии (см. табл.), говорит об отсутствии редких гаплотипов и указывает на возможный

всплеск численности и рост популяции. Такие же показатели можно отметить в целом для восточной линии мтДНК [1, 5]. Отрицательный показатель  $T's D$  у второй линии ( $T's D = -0.56$ ), говорит о низком числе выявленных гаплотипов по сравнению с числом варьируемых сайтов (избыток редких аллелей).

Анализ генетических особенностей популяции обыкновенной полевки, а также выделение различных гаплогрупп свидетельствует о хорошей разрешающей способности маркеров мтДНК (*cyt b*) для оценки «белорусской» популяции.

### Заключение

Уровень изменчивости митохондриальных фрагментов *cyt b* *Microtus arvalis* из Беларуси оказался достаточно высоким ( $Hd \pm SD_{Hd} = 0.97 \pm 0.02$ ), что проявляется в большом числе выявленных гаплотипов мтДНК ( $n = 41$ ) из 53 нуклеотидных последовательностей.

Генетическое разнообразие *cyt b* мтДНК обыкновенной полевки в Беларуси и на близлежащих территориях однородно. Исследуемые выборки обыкновенной полевки из Беларуси можно разделить на две генетически обособленные группы.

Изучение распределения выявленных гаплотипов обыкновенной полевки по территории Беларуси не выявило какой-либо связи с флористической специфичностью территорий. Однако распределение выявленных гаплотипов по различным ландшафтно-географическим районам, напротив, хорошо соотносится с нахождением в том или ином кластере.

### Литература

1. Bužan, E. V. A new cytochrome b phylogroup of the common vole *Microtus arvalis* endemic to the Balkans and its implications for the evolutionary history of the species / E. V. Bužan, D. W. Förster, J. B. Searle, B. Kryštufek // Biological Journal of the Linnean Society, — 2010, — V. 100. — P. 788–796.
2. Martínková, N. Divergent evolutionary processes associated with colonization of offshore islands / N. Martínková, R. Barnett, T. Cucchi, at other // Molecular Ecology, — 2013, — V. 22, — P. 5205–5220.
3. Tougaard, C. New insight into the colonization processes of common voles: inferences from molecular and fossil evidence / C. Tougaard, E. Renvoisé, A. Petitjean, J. P. Quéré // PLoS ONE, — 2008. — V. 3(10). — P. 1–10.
4. Шефтель Б. И. Методы учета численности мелких млекопитающих / Б. И. Шефтель // Russian Journal of Ecosystem Ecology. — 2018. — №3. — С. 1–21.
5. Stojak, J. Post-glacial colonization of eastern Europe from the Carpathian refugium: evidence from mitochondrial DNA of the common vole *Microtus arvalis* / J. Stojak, D. Allan, J. S. McDevitt, at other // Biological Journal of the Linnean Society, — 2015. — Volume 115, — Issue 4, — P. 927–939.

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СЫВОРОТОЧНОГО ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА\*

И. А. Меднова, А. С. Бойко

*НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томск*

✉ i.mednova@yandex.ru

### Аннотация

Представлены результаты сравнительного исследования профиля 22 сывороточных цитокинов, полученных у 236 больных шизофренией (F20) и 103 здоровых лиц. Концентрацию цитокинов в сыворотке крови определяли методом мультиплексного анализа. Выявили статистически значимое повышение TGF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL5, IL8, IL10, IL15, IL1RA и TNF $\alpha$  у пациентов с шизофренией по сравнению с показателем у здоровых лиц. Концентрация цитокинов зависела от пола и ИМТ исследуемой выборки.

### Введение

Шизофрения представляет собой гетерогенное психическое расстройство, ключевую роль в развитии которого отводят дисбалансу нейромедиаторных систем в ЦНС [1]. В последние годы активно обсуждается гипотеза иммунной дисрегуляции при шизофрении, согласно которой в основе заболевания лежит неконтролируемая активация провоспалительных цитокинов и микроглии [2, 3]. При шизофрении наблюдается повышение ряда провоспалительных цитокинов [4], однако данные по содержанию конкретных маркеров были противоречивыми. Несответствие данных цитокинового профиля могут быть обусловлены множеством причин: клинической картиной шизофрении; небольшими размерами выборки; вариабельностью показателей у мужчин и женщин; отсутствием учета сопутствующих метаболических нарушений, в том числе, часто встречающегося антипсихотик-индуцированного набора веса. В данном исследовании изучили содержание 22 цитокинов у больных шизофренией в зависимости от пола и ИМТ.

### Пациенты и методы

В исследование включили 236 больных шизофренией (F20 по МКБ-10) и 103 психически и соматически здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту. Концентрацию 22 цитокинов в сыворотке крови определяли с использованием панели HCYTMAG-60K (Merck, Germany) на мультиплексных анализаторах Magpix и Luminex 200 (Luminex, USA) на базе ЦКП «Медицинская геномика» (Томский НИМЦ). Статистическую обработку данных проводили с помощью SPSS 21.0. Сравнение данных, не соответствующих нормальному закону распределения, проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

В ходе исследования было выявлено статистически значимое повышение TGF $\alpha$  ( $p = 0,014$ ), IFN $\gamma$  ( $p = 0,036$ ), IL5 ( $p = 0,0001$ ), IL8 ( $p = 0,007$ ), IL10 ( $p = 0,007$ ), IL15 ( $p = 0,001$ ), IL1RA ( $p = 0,005$ ) и TNF $\alpha$  ( $p = 0,0001$ ) у пациентов с шизофренией по сравнению с показателем у здоровых лиц. При анализе в подгруппах было обнаружено гораздо большее количество различий по уровню цитокинов у женщин, чем у мужчин. Так у женщин с шизофренией наблюдалось статистически значимое повышение концентрации TGF $\alpha$  ( $p = 0,006$ ), IFN $\gamma$  ( $p = 0,005$ ), IL10 ( $p = 0,001$ ), IL12p40 ( $p = 0,001$ ), IL15 ( $p = 0,001$ ), IL17A ( $p = 0,037$ ), IL1RA ( $p = 0,023$ ), IL5 ( $p = 0,006$ ), IL8 ( $p = 0,004$ ) и TNF $\alpha$  ( $p = 0,0001$ ), и снижение уровня IL3 ( $p = 0,046$ ) по сравнению со здоровыми женщинами. У мужчин с шизофренией отмечалось статистически значимое повышение уровня IL10 ( $p = 0,017$ ), IL5 ( $p = 0,048$ ) и TNF $\alpha$  ( $p = 0,025$ ) по сравнению с здоровыми мужчинами. Было выявлено статистически значимое повышение TGF $\alpha$  ( $p = 0,044$ ), IL10 ( $p = 0,016$ ) и IL5 ( $p = 0,044$ ) у больных шизофренией с ИМТ  $< 5$  по сравнению с показателем у здоровых лиц с сопоставимым ИМТ. При шизофрении с ИМТ  $\geq 25$  отмечалось статистически значимое повышение концентрации IL1RA ( $p = 0,003$ ) на фоне снижения уровня IL17A ( $p = 0,020$ ), и IL7 ( $p = 0,045$ ).

### Выводы

На основании полученных результатов можно сделать вывод о наличии иммунологических нарушений, лежащих в основе шизофрении. Однако при оценке данных также важно учитывать пол пациента и сопутствующие метаболические нарушения.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ 22-25-00633 «Ростовые факторы и хемокины при шизофрении: новые подходы к анализу данных»

**Литература**

1. Stahl S.M. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate // *CNS spectrums*. 2018. — V. 23. №. 3. P. 187-191.
2. Na K. S., Jung H. Y., Kim Y.K. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2014. V. 48. P. 277-286.
3. Howes O. D., McCutcheon R. Inflammation and the neural diathesis-stress hypothesis of schizophrenia: a reconceptualization// *Translational psychiatry*. 2017. V. 7. №. 2. P. e1024-e1024.
4. Dawidowski B. The role of cytokines in the pathogenesis of schizophrenia // *Journal of Clinical Medicine*. 2021. V. 10. №. 17. P. 3849.

## СВЯЗЬ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ АУТОАНТИТЕЛ И ИХ КАТАЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ\*

М. М. Меламуд<sup>1</sup>, Е. А. Ермаков<sup>1,2</sup>, Г. А. Невинский<sup>1,2</sup>, В. Н. Бунева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ Marken94@mail.ru

### Аннотация

В работе проанализирована связь концентрации цитокинов с титрами аутоантител и уровнями их каталитических активностей при СКВ. Выявлена отрицательная корреляция титров аутоантител против гистонов, ssДНК и dsДНК с концентрацией IL-5. Показано, что уровни ДНК- и гистон-гидролизующих активностей отрицательно коррелировали с концентрацией хемокинов (IL-8, MDC, MCP-1 $\alpha$ ) и цитокина sCD40L.

Нарушение цитокиновой регуляции образования антител связано с развитием аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка (СКВ). Данная работа посвящена анализу концентрации цитокинов с титрами аутоантител и уровнями их каталитических активностей.

В исследовании использовалась сыворотка крови больных СКВ (n = 53) и здоровых доноров (n = 35). Материал предоставлен ГКБ № 1, Новосибирск. Официальный диагноз СКВ поставлен пациентам в различных лечебных учреждениях Новосибирска на основании современных клинических рекомендаций. Медианный возраст пациентов 50 лет. Концентрация цитокинов оценивалась мультиплексным набором Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (НСУТМАГ-60К-РХ41) производства Merck Millipore на базе ЦКП «Медицинская геномика» ТНИМЦ (г. Томск). Оценивались цитокины: EGF, FGF-2, Eotaxin, TGF- $\alpha$ , G-CSF, Flt-3L, GM-CSF, Fractalkine, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , GRO, IL-10, MCP-3, IL-12P40, MDC, IL-12P70, PDGF-AA, IL-13, PDGF-AB/BB, IL-15, sCD40L, IL-17A, IL-1RA, IL-1 $\alpha$ , IL-9, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1b, RANTES, TNF- $\alpha$ , TNF-b, VEGF. Концентрация анти-ssДНК антител, анти-dsДНК антител, антител против гистонов, а также общего IgG в сыворотке измерялась методом ИФА. ДНК- и гистон-гидролизующая (гистоны H1, H2A, H2B, H4) активности антител тестировались методом электрофореза в ПААГ с последующей обработкой результатов в программе ImageLab. Статистическая обработка результатов (коэффициент ранговой корреляции Спирмена, поправка на множественную проверку гипотез методом Беньямини-Хохберга) проводилась в программах MS Excel 2016 и OriginPro 2022.

Уровни 20-ти из 41-го проанализированного цитокина оказались значимо выше у больных СКВ. Концентрация IL-5 отрицательно коррелировала с уровнями аутоантител к ssДНК (R = -0,58, p = 0,01), dsДНК (R = -0,66, p < 0,01) и гистонам (R = -0,54, p = 0,02). Уровень ДНК-гидролизующей активности отрицательно коррелировал с концентрацией следующих хемокинов: фракталкин — R = -0,5, p < 0,01; MDC — R = -0,4, p < 0,01, IL-8 — R = -0,33, p = 0,03, MIP-1 $\alpha$  — R = -0,33, p = 0,04. Уровень гистон-гидролизующей активности отрицательно коррелировал с концентрацией хемокина фракталкин и цитокина sCD40L. ДНК-гидролизующая активность аутоантител достоверно положительно коррелировала с уровнем гистон-гидролизующей активности.

Отрицательная корреляция между концентрациями аутоантител и IL-5 может быть связана с регуляторной ролью IL-5 на В-клетки. Известно, что IL-5 стимулирует развитие В-клеток и продукцию иммуноглобулинов. Уменьшение секреции IL-5 может нарушать процесс синтеза антител и приводить к увеличению титра аутоантител. Корреляция уровней каталитических активностей антител с концентрацией фракталкина, MDC, IL-8, MIP-1 $\alpha$  и sCD40L может указывать на регуляторную роль данных цитокинов в образовании каталитических антител. Положительная корреляция между уровнями ДНК- и гистон-гидролизующих активностей антител при СКВ может объясняться тем, что такие антитела образуются к комплексам ДНК-гистоны. Поэтому каталитические антитела при СКВ эффективно гидролизуют как ДНК, так и гистоны. Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов регуляции образования аутоантител, в том числе и обладающих каталитическими активностями.

\* Работа поддержана грантом РФФ № 20-15-00162.



## СТРУКТУРА И СВОЙСТВА RBD SARS-COV-2, ПОЛУЧЕННОГО В КЛЕТКАХ CHO-K1 ПРИ МОНОСЛОЙНОМ И СУСПЕНЗИОННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ\*

Ю. А. Меркульева, А. А. Исаева, В. Н. Несмеянова, Н. В. Волкова, В. С. Арипов,  
Д. В. Шаньшин, Е. А. Волосникова, М. Б. Боргоякова, Д. Н. Щербаков

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,  
Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности  
и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития  
генетических технологий, р. п. Кольцово*

✉ j.a.merkulyeva@gmail.com

### Аннотация

В работе исследованы вторичная структура, антигенные и иммуногенные свойства RBD SARS-CoV-2, полученного при монослойном и суспензионном культивировании клеток продуцента CHO-K1-RBD. Установлено, что RBD, секретируемый клетками CHO-K1 при суспензионном культивировании имеет структуру и свойства наиболее близкие нативному домену в составе S-белка SARS-CoV-2.

Рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV-2, получаемый в системах экспрессии бактерий, дрожжей, растений и клеток млекопитающих используют для разработки средств терапии, профилактики и диагностики COVID-19. Чаще всего для продукции RBD используют клетки млекопитающих, поскольку они способны обеспечить синтез белка с сохранением его посттрансляционных модификаций (гликозилирование а.о. и образование s-s мостиков).

Однако свойства рекомбинантных белков, как известно, зависят не только от особенностей продуцента, но и от выбора способа культивирования клеток. Это особенно важно при производстве терапевтических средств и субъединичных вакцин.

Целью нашего исследования было изучение структуры и свойств RBD SARS-CoV-2, полученного в клетках CHO-K1 при монослойном и суспензионном культивировании.

Ранее на основе клеточной линии CHO-K1 мы разработали штамм CHO-K1-RBD, и показали секрецию RBD SARS-CoV-2 (308V — 542N) при монослойном культивировании на роллерных установках (патент РФ № №2752858). В данной работе клетки продуцента были адаптированы к суспензионному культивированию, что на порядок повысило выход целевого белка.

По результатам электрофореза RBD в ДСН-ПААГ монослойный и суспензионный способы культивирования клеток продуцента обеспечивали продукцию гликозилированной формы белка с примесью димеров и тримеров. Оба препарата RBD при эксклюзионной хроматографии показали наличие в растворе димеров и в меньшей степени тримеров RBD с преобладанием мономерной формы (не менее 50 %).

Мы провели анализ вторичной структуры RBD с помощью метода кругового дихроизма и установили, что вторичная структура обоих RBD представлена в основном антипараллельными  $\beta$ -складчатыми структурами, однако RBD из суспензионной культуры отличается меньшим вкладом  $\alpha$ -спиралей (2 % против 16 %). Согласно данным PDB, это может свидетельствовать о более правильной укладке полипептидной цепи RBD при синтезе в суспензионной культуре.

Методом биослойной интерферометрии было установлено, что RBD, полученный при суспензионном культивировании, обладает большим сродством к своему рецептору ACE2, чем RBD, полученный при монослойном культивировании ( $KD = 5,3 \times 10^{-9}$  М и  $5,8 \times 10^{-8}$  М соответственно). В эксперименте по иммунизации мышей линии BALB/c в группе, получавшей RBD из суспензионной культуры, средний геометрический титр специфических IgG в ИФА был на порядок выше ( $1:1,34 \times 10^6$  против  $1:2,58 \times 10^5$ ), а средний геометрический титр вируснейтрализующих антител составил  $\geq 1:1280$  против 1:343 соответственно.

Таким образом, RBD, секретируемый клетками CHO-K1 при суспензионном культивировании, имеет вторичную структуру, близкую нативной и обладает более выраженными антигенными и иммуногенными свойствами, чем RBD, полученный при монослойном культивировании продуцента штамм CHO-K1-RBD.

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

© Ю. А. Меркульева, А. А. Исаева, В. Н. Несмеянова, Н. В. Волкова, В. С. Арипов, Д. В. Шаньшин, Е. А. Волосникова, М. Б. Боргоякова, Д. Н. Щербаков, 2022

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА RTX-ТОКСИНА *MORGANELLA MORGANII*\*

Л. Ф. Миннуллина, Г. И. Халиуллова, А. М. Марданова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ masaco@mail.ru

### Аннотация

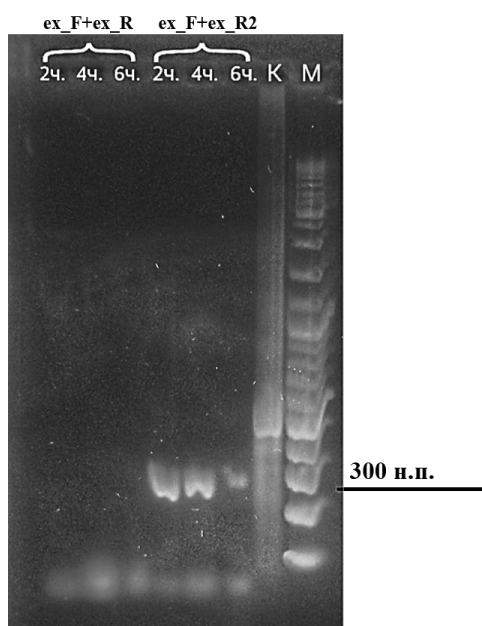
RTX-токсины являются важными факторами вирулентности болезнетворных бактерий. В данной работе была определена экспрессия гена *hlyA* уropатогенного штамма *M. morganii* MM 190, обладающего выраженной гемолитической активностью. Показано, что экспрессия гена наблюдается начиная со 2 ч роста, а для *M. morganii* характерно образование усеченного варианта транскрипта *hlyCABD* — *hlyCA*.

Порообразующие токсины семейства RTX (Repeat in toxin) являются важными факторами вирулентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей (ИМП). К подобным микроорганизмам относится и *Morganella morganii* — условно-патогенная бактерия, которая по данным платформы AMRmap (<https://amrmap.ru/>) занимает 9 место среди наиболее частых возбудителей внебольничных ИМП в РФ. Около 50 % клинических изолятов *M. morganii* обладают способностью к гемолизу, что в большинстве случаев может быть связано с синтезом RTX-токсина, родственного  $\alpha$ -гемолизину (HlyA) *E. coli*. Ген *hlyA* входит в состав *hlyCABD*-оперона, который включает также гены *hlyC* (ацетилтрансфераза, активирующая токсин), *hlyB* и *hlyD* (кодируют транспортные белки).

Используемый в работе штамм *M. morganii* MM 190 был выделен в 2015 г. на базе ООО ЛДЦ «Биомед» (г. Казань) из мочи пациента с внебольничной ИМП. Ранее нами было показано, что данный штамм проявляет выраженную гемолитическую активность на эритроцитах человека (при использовании кровяного агара и 2 % суспензии эритроцитов), а максимум его активности приходится на 2 ч роста. В секвенированном геноме штамма MM 190 (QMKL00000000) был обнаружен ген *hlyA* (3075 н.п.).

Известно, что ген *hlyA* *E. coli* экспрессируется на экспоненциальной фазе роста. Определение экспрессии гена гемолизина MM 190 проводили методом обратной транскрипции. Для этого из 2, 4 и 6-часовых культур штамма выделяли тотальную РНК, которую использовали для получения кДНК, после чего проводили классическую ПЦР. В работе были использованы праймеры *ex\_F* (ACCCGACGAGCAAGACAATC), *ex\_R* (AAATCCAGGCCCTTACCATCA) и *ex\_R2* (ACATCATGCCCTTACCTGC). Пару праймеров *ex\_F-ex\_R* (размер ПЦР-продукта — 1609 н.п.), комплементарных внутренним участкам генов *hlyA* и *hlyB* соответственно, применяли для определения фрагмента полноразмерного транскрипта с оперона или выявления контаминации геномной ДНК в случае наличия внутреннего терминатора. Пару праймеров *ex\_F-ex\_R2* (размер ПЦР-продукта — 254 н.п.), комплементарных внутреннему участку гена *hlyA*, использовали для определения экспрессии гена гемолизина.

Как видно из электрофореграммы (рис.), в пробах с праймерами *ex\_F-ex\_R* ПЦР-продуктов обнаружено не было. Это может свидетельствовать об образовании усеченного варианта транскрипта *hlyCA*, что происходит при остановке транскрипции на терминаторе, расположенном между генами *hlyA-hlyB*. Тем временем, во всех пробах с праймерами *ex\_F-ex\_R2* реакция прошла, что говорит о том, что ген *hlyA* действительно экспрессируется на 2-6 ч роста. С помощью программы FindTerm (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=findterm&group=programs&subgroup=gfindb>) между генами *hlyA* и *hlyB* была иден-



Электрофореграмма ОТ-ПЦР-продуктов с тотальной РНК 2, 4 и 6-часовых культур *M. morganii* MM 190 для определения экспрессии гена *hlyA*. *ex\_F+ex\_R* — определение наличия внутреннего терминатора, *ex\_F+ex\_R2* — определение экспрессии гена *hlyA*, М — ДНК-маркеры GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), К — тест на активность обратной транскриптазы

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №22-75-00017.  
© Л. Ф. Миннуллина, Г. И. Халиуллова, А. М. Марданова, 2022

---

тифицирована последовательность гипотетического ро-независимого терминатора, что может объяснять отсутствие транскрипции гена *hlyB*.

Таким образом, нами было показано, что в клетках уропатогенного штамма *M. morganii* ММ 190 на 2-6 ч роста наблюдается экспрессия гена *hlyA*, кодирующего гомолог  $\alpha$ -гемолизина *E. coli*. Установлено, что для *M. morganii* также характерно образование усеченного варианта транскрипта *hlyCA*, что может говорить о присутствии терминатора между генами *hlyA* и *hlyB*.

## СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

М. В. Миронова, О. В. Горюнова, И. С. Голубева, Я. О. Садовская

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва

✉ mv\_mironova@ronc.ru

В рамках научно-исследовательской работы были синтезированы не описанным в литературе способом новые аминокислотные производные индоло[2,3а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона (АПГИК), структуру и чистоту полученных соединений подтвердили, используя данные спектров <sup>1</sup>H-ЯМР и масс-спектров высокого разрешения ESI [1]. В опытах *in vitro* и *in vivo* были подтверждены предсказанные с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), данные *in silico*, о высокой вероятности противоопухолевой активности АПГИК и о низкой вероятности их цитотоксической активности [2,3]. При изучении цитотоксической активности указанных соединений *in vitro* на клетках линий рака яичников SKOV3, карциномы молочной железы MCF7 и SKBR3, рака толстой кишки LS174T и HCT 116 незначимые индексы цитотоксической активности IC<sub>50</sub> > 10 мкМ, были подтверждены в МТТ-тесте [2]. *In vivo* на мышах с перевиваемыми гормонозависимыми опухолями — рак шейки матки РШМ-5 и аденокарцинома молочной железы Ca-755 — соединения АПГИК подтвердили значимую противоопухолевую активность и переданы на углублённое доклиническое изучение [1,3].

### Литература

1. Горюнова О. В., Миронова М.В., Голубева И.С. // RU 2755572C1, 17.09.2021.
2. Апрышко Г.Н., Жукова О.С., Фетисова Л.В., Власенкова Н.К., Пугачева Р.Б., Горюнова О. В. Изучение свойств потенциальных противоопухолевых аминокислотных производных гликозидов индокарбазолов *in silico* и *in vitro*// Российский биотерапевтический журнал. — 2017. — Т. 16. — № 4. — С. 46–54.
3. Голубева И.С., Горюнова О.В., Яворская Н.П.. Сравнительное изучение *in vivo* потенциальных противоопухолевых свойств в ряду аминокислотных производных гликозидов индокарбазола// Российский биотерапевтический журнал. — 2018. — Т. 17. — № 2. — С. 71–77.

## РАЗРАБОТКА АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С РЕЦЕПТОРАМИ CD47 И PD-L1 ДЛЯ ТЕРАПИИ PD-L1+ ОПУХОЛЕЙ

А. К. Мисорин, А. Х. Сабилов, А. Д. Азарян, Т. А. Водопьянова,  
С. А. Легоцкий, А. А. Гордеев, А. Н. Доронин, В. В. Соловьев, М. С. Карбышев

АО «БИОКАД», Санкт-Петербург

✉ misorinak@mail.ru

### Аннотация

Антиген CD47 — рецепторная молекула, представленная как на здоровых клетках (эритроциты, эпителиальные клетки), так и на различных типах опухолевых клеток. Также CD47 взаимодействует с лигандом SIRPα на макрофагах и передает сигнал «не ешь меня» для ингибирования опосредованного фагоцитоза опухоли. Таргетинг молекул CD47 представляется перспективным в иммунотерапии рака. В свою очередь, PD-L1 — ингибиторный мембранный белок, преимущественно представленный на опухолевых клетках и регуляторных иммунных клетках в микроокружении опухоли. После связывания белком-рецептором PD-1, PD-L1 ингибирует функции опухолеспецифических Т-клеток, создавая локально дефицитную иммунную среду и предотвращая цитотоксический цитолитический эффект.

Высокий уровень представленности CD47 на эритроцитах значительно ограничивает возможности терапии злокачественных новообразований антителами против данного антигена и приводит к серьезной гематотоксичности.

Целью данной работы является получение биспецифического антитела (бсАт) к CD47 и PD-L1, способного блокировать взаимодействие CD47 с лигандом — SIRPα, и, как следствие, предотвращать передачу сигнала «не ешь меня» от опухолевых клеток к макрофагам; при этом дополнительно блокируя взаимодействие PD1 с PD-L1, тем самым препятствуя уходу опухолевой клетки от уничтожения Т-клетками. Помимо этого, целевое бсАт должно обладать пониженной специфичностью к здоровым клеткам, которые могут обладать высоким уровнем представленности CD47. В перспективе кандидатное бсАт предполагается использовать для терапии солидных опухолей.

В ходе выполнения работ по данной теме нами были получены препараты внеклеточных доменов антигенов CD47 и PD-L1; а также препараты антитела В6Н12 в моноспецифическом и биспецифическом формате; разработаны клеточные тесты для характеристики полученных антител.

После этапа иммунизации лам рекомбинантным белком CD47 нами сконструирована библиотека генов антител. Посредством фагового дисплея и секвенирования получен набор уникальных антиген-связывающих фрагментов, способных к высокоспецифичному взаимодействию с антигеном CD47. Для всех антител с помощью биослойной интерферометрии определены константы аффинности ( $KD \sim 10^{-9}$ ) к CD47, а также подтверждена способность конкурентно блокировать взаимодействие рекомбинантных белков CD47 и SIRPα.

Полученный в ходе работы лидерный кандидат, отобранный в соответствии с критериями (степень гуманизации и стабильность), был переведен в формат бсАт с общей легкой цепью, второй специфичностью которого был PD-L1.

Разработанное бсАт тестировали *in vitro* на способность индуцировать фагоцитоз опухолевых клеток HCC70 макрофагами. В результате экспериментов было показано, что данные антитела активируют фагоцитарную активность макрофагов, приводящую к деплеции клеток опухолевой линии HCC70. В ходе проведения дальнейшей работы планируется провести оценку активности разработанного бсАт *in vivo*.

Полученные бсАт, способные одновременно задействовать и врожденный и приобретенный иммунитет путем привлечения макрофагов и Т-клеток, могут стать перспективным подходом таргетной иммунотерапии солидных опухолей. Потенциально, данное антитело может стать первым в классе данных препаратов.

СКРИНИНГ R-ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ *PINUS SYLVESTRIS* К МИКРОМИЦЕТЕ *FUSARIUM SP.*

Л. В. Можаровская

Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

✉ milamozh@yandex.ru

**Аннотация**

Для восприимчивой и устойчивой к *Fusarium sp.* группам проростков *Pinus sylvestris* проведен транскриптомный анализ с последующим скринингом семейств R-генов. Получены новые данные о структурном разнообразии R-генов *P. sylvestris* и о потенциальных молекулярных маркерах устойчивых генотипов.

Гены устойчивости (R-гены) растений к болезням играют ключевую роль в распознавании белков патогенов, кодируемых специфическими генами авирулентности (Avr-гены). В настоящее время установлено, что белки R-генов характеризуются модульной доменной структурой, которая определяет особенности их функционирования, в частности способность образования сигнальных комплексов, активизирующих защитные реакции, направленные на подавление фитопатогенов.

В настоящем исследовании для *Pinus sylvestris* проводился поиск R-генов с установлением доменной структуры кодируемых белков. В опытных условиях (при сохранении контрольного варианта) проводилось заражение проростков *P. sylvestris* культурой микромицета *Fusarium sp.* (NCBI GenBank: MW429282.1). В ходе исследования патосистемы *Pinus sylvestris* — *Fusarium sp.* были выделены устойчивая и восприимчивая (с признаками инфекционного полегания) группы растений. Ткани корня и гипокотили использовали для получения препаратов мРНК, высокопроизводительное секвенирование транскриптомов исследуемых групп растений выполняли на базе Ion Torrent. Идентификацию R-генов проводили при использовании базы данных консервативных доменов (CDD) NCBI.

По результатам биоинформатического анализа транскриптомных данных исследуемых групп *P. sylvestris*, и на основе изучения особенностей структурной организации функциональных доменов, идентифицировано 350 транскриптов R-генов. Согласно представленным в литературе данным, в зависимости от наличия специфических доменов, транскрипты R-генов были отнесены к различным функциональным семействам. Так, присутствие транскриптов семейства нуклеотидсвязывающих генов с лейцин-богатыми повторами (NBS-LRR) отмечено для всех исследуемых групп проростков *P. sylvestris*, в том числе содержащие: Toll-подобный интерлейкиновый рецептор (TIR), CC-домен, домен RPW8, домен PLN03210. Следует отметить, что отличительно в транскриптоме устойчивой к *Fusarium sp.* группе проростков *P. sylvestris* идентифицированы транскрипты генов NBS-LRR с функциональным доменом RX-CC\_like (cd14798) класса CC-NBS-LRR. Среди R-генов семейства рецептороподобных киназ (RLK) идентифицированы транскрипты, кодирующие полипептиды с функциональным лейцин-богатым доменом LRR-RLK. Одним из наиболее представленных семейств являлись серин/треонин киназы (STK), в том числе содержащие те или иные домены и мотивы: LRR — лейцин-богатые повторы, LysM — лизин-содержащий мотив, TPR — тетратрикопептидный повтор.

Полученные результаты представляют новую информацию о структурном разнообразии R-генов *P. sylvestris*, участвующих в формировании специфического иммунитета в ответ на инфицирование *Fusarium sp.*, а также о потенциальных молекулярных маркерах для идентификации устойчивых генотипов.

**ЭФФЕКТ АМИСУЛЬПРИДА НА ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТАУ-БЕЛКА В МОЗГЕ КРЫС OXYS**

К. А. Молобекова

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

✉ k.molobekova@g.nsu.ru

**Аннотация**

Нейродегенерация при болезни Альцгеймера (БА) связана с различными нарушениями, одним из которых является гиперфосфорилирование тау-белка. В данной работе мы исследовали влияние амисульприда, антагониста серотониновых рецепторов 7 типа (5-HT7), на гиперфосфорилирование тау-белка в мозге крыс OXYS, доказанной модели БА.

Болезнь Альцгеймера является одной из наиболее распространенных причин деменции во всем мире. Поэтому поиск препаратов, способных улучшить состояние больных и предотвратить развитие болезни, является актуальной задачей. В данной работе был изучен терапевтический потенциал амисульприда, антагониста 5-HT7, на линии крыс OXYS, подтвержденной модели БА. В частности, было изучено его влияние на гиперфосфорилирование тау-белка, которое является одним из ключевых событий развития БА.

Нами было показано, что хроническое введение амисульприда приводит к значительному снижению фосфорилирования тау-белка во фронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS. Кроме того, мы обнаружили изменение экспрессии CDK5, одной из основных киназ, вовлеченных в патологическое фосфорилирование тау-белка при БА. Согласно работе 2021 г. Labus и соавторов, 5-HT7 образует белковые комплексы с CDK5 и влияет на ее активность, за счет чего блокада 5-HT7 позволяет снизить уровень фосфорилирования тау-белка [1]. Обнаруженное нами изменение экспрессии CDK5 может подтверждать данный механизм действия антагонистов 5-HT7 на фосфорилирование тау-белка.

С помощью теста приподнятый крестообразный лабиринт мы установили, что амисульприд оказал анксиолитическое действие на крыс, снизив признаки тревожного поведения и увеличивая их двигательную и исследовательскую активность. Полученный нами результат согласуется с тем, что амисульприд применяется в качестве нейролептика и антидепрессанта для лечения шизофрении, депрессии и ряда других расстройств.

Таким образом, мы обнаружили, что хроническое введение амисульприда приводит к снижению патологического гиперфосфорилирования тау-белка, а также оказывает противотревожный эффект на крыс OXYS. Сочетание свойств этиотропного и симптоматического лекарственного препарата делает амисульприд потенциальным терапевтическим средством для лечения БА и других заболеваний, связанных с гиперфосфорилированием тау-белка.

**Литература**

1. Labus J. et al. Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT7 receptor // Prog. Neurobiol. 2021. V. 197, № August 2020.

## НОВЫЙ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА

В. Г. Молчанов<sup>1,2</sup>, А. Е. Егоров<sup>1</sup>, В. Ю. Новиков<sup>3</sup>, Н. М. Новожилов<sup>4</sup>, Н. В. Молочков<sup>1</sup>, М. А. Тимченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино

<sup>2</sup>Обнинский институт атомной энергетики —

филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск

<sup>3</sup>Полярный научно-исследовательский институт

морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н. М. Книповича, Мурманск

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии им. Академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

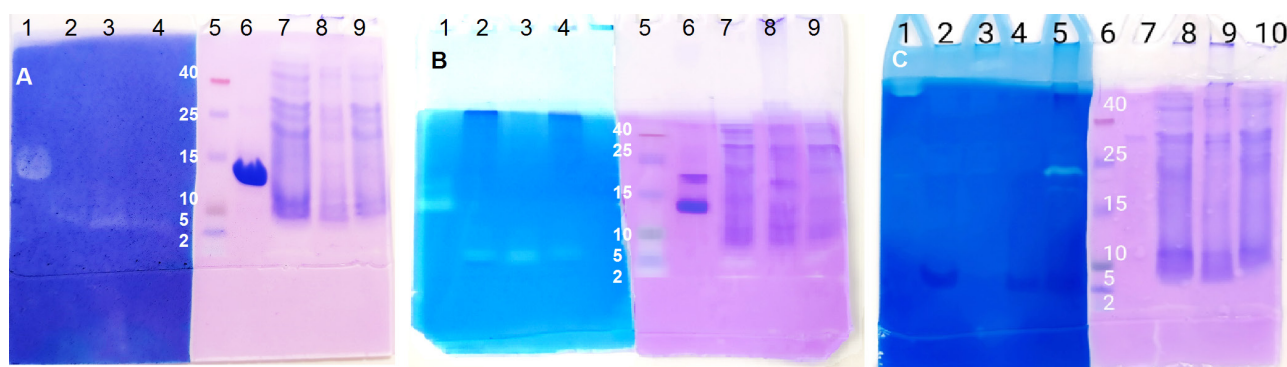
✉ vlad-avak@mail.ru

### Аннотация

Гепатопанкреас камчатского краба (ГПК) представляет собой отходы крабового промысла и в то же время является источником ценных ферментов. Целью нашей работы было исследование антибактериальных свойств экстрактов гепатопанкреаса и выявление в них белка, определяющего антибактериальную активность.

Гепатопанкреас камчатского краба является ценным источником разнообразных ферментов, интерес к которым возрос в последние годы в связи с перспективой их применения в различных отраслях хозяйства [1]. Внимание исследователей, в основном, привлекают протеолитические ферменты, такие как коллагеназы, для создания на их основе ранозаживляющих препаратов [2]. Однако не меньший интерес представляют и антимикробные белки и пептиды (АМП) крабов. За время своего длительного существования ракообразные, несмотря на отсутствие высокоспецифичной адаптивной иммунной системы как у позвоночных, успешно адаптировались к выживанию в своей естественной среде обитания, богатой микроорганизмами, в том числе и благодаря наличию таких иммунных эффекторов, как АМП, лизоцим и другие ферменты. Известно, что многие антимикробные белки и пептиды проявляют высокую специфичность в отношении прокариот и низкую токсичность в отношении эукариотических клеток, что позволяет рассматривать их в качестве альтернативы антибиотикам, поэтому актуальной задачей является поиск новых бактериолитических факторов, которые в дальнейшем могут найти применение, как в медицине, так и в пищевой промышленности, например, в качестве биоконсервантов в продуктах питания.

Методом зимографии нами было обнаружено, что в состав экстрактов пептидов и низкомолекулярных белков, полученных из ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба, входит небольшой пептид (около 5 кДа), который гидролизует как клеточную стенку *M. lysodeikticus*, так и полисахарид клеточной стенки *M. lysodeikticus*, но не активен в отношении желатина (см. рисунок).



Исследование методом зимографии активности в отношении: *a* — клеточной стенки. 1,6 — лизоцим; 2,7 — ГПК-АСН; 3,8 — ГПК-ДТТ; 4,9 — ГПК-АСН-ГК; 5 — маркеры молекулярного веса; *b* — полисахарида клеточной стенки. 1,6 — лизоцим; 2,7 — ГПК-АСН; 3,8 — ГПК-ДТТ; 4,9 — ГПК-АСН-ГК; 5 — маркеры молекулярного веса; *c* — желатина. 1,7 — протеиназа К; 2,8 — ГПК-АСН; 3,9 — ГПК-ДТТ; 4,10 — ГПК-АСН-ГК; 5 — экстракт исходного ацетонового порошка ГПК в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5; 6 — маркеры молекулярного веса. ГПК-АСН — экстракт ацетонового порошка ГПК, полученный с помощью ацетонитрила; ГПК-ДТТ — экстракт ГПК, полученный с помощью дитиотреитола; ГПК-АСН-ГК — экстракт ГПК, полученный с помощью ацетонитрила в присутствии гиалуроновой кислоты



Добавление экстрактов, содержащих этот пептид, значительно подавляло рост грамположительных микроорганизмов, таких, как *B.cereus*, и на раннем этапе задерживало рост грамотрицательных бактерий, таких, как *E.coli*.

Таким образом, найденный в гепатопанкреасе камчатского краба пептид, обладающий гидролазной активностью, представляет собой ранее не описанный бактериолитический фактор. Обнаружение новых белков и пептидов с антибактериальной активностью позволяет расширить диапазон средств антибактериальной защиты, что на данный момент, несомненно, является актуальной задачей в связи с появлением устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий.

#### **Литература**

1. Ponomareva T., Timchenko M., Filippov M., Lapaev S.; Sogorin E. Prospects of Red King Crab Hepatopancreas Processing: Fundamental and Applied Biochemistry // Recycling. 2021. V. 6, P. 3.
2. Glyantsev S.P., Vishnevsky A.V., Adamyanyan A.A., Vishnevsky A.V., Sakharov I.Y. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27937744/> // J Wound Care. 1997. V. 6. P. 13-16.

## НАРУШЕНИЕ КООРДИНАЦИИ ДВИЖЕНИЯ У МЫШЕЙ ДИКОГО ТИПА ВСЛЕДСТВИЕ ПОЯВЛЕНИЯ ТРЕВОЖНОГО ПОВЕДЕНИЯ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРИЁМЕ МЕМАНТИНА

Л. Д. Мосина, А. Г. Милейко

Сибирский федеральный университет,  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Красноярск

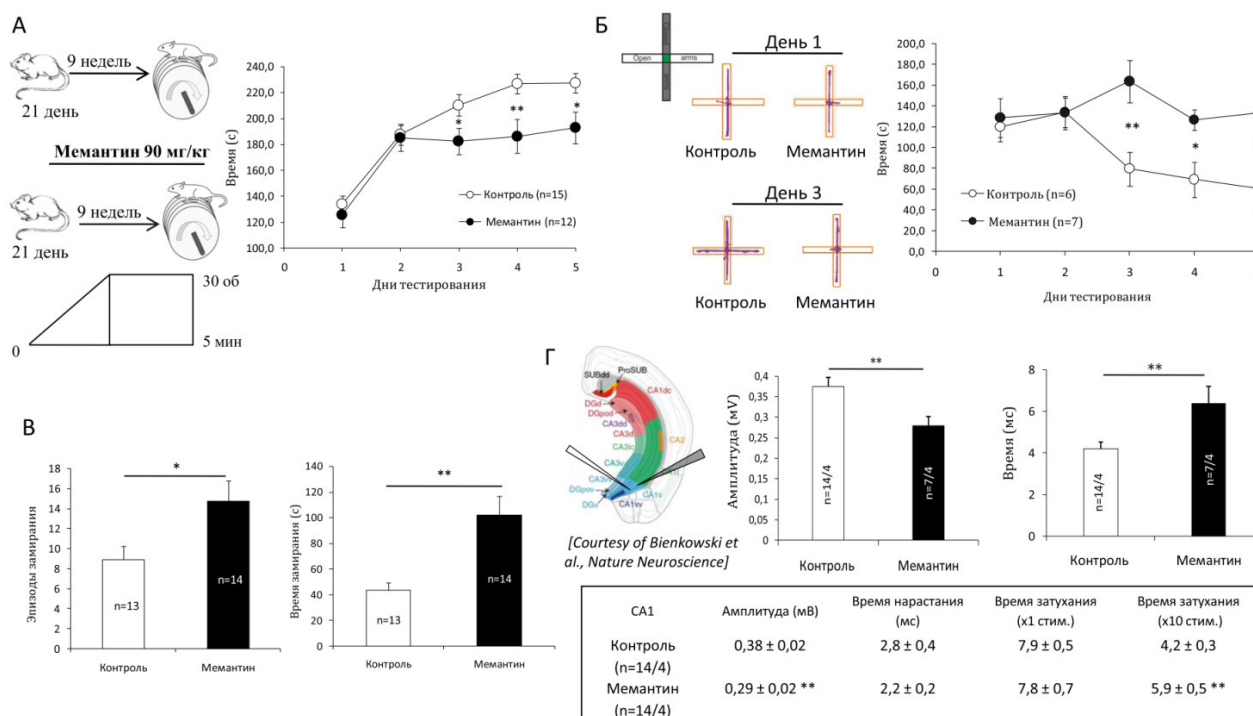
✉ l-mosina00@mail.ru

### Аннотация

Мемантин — препарат, блокирующий NMDA-рецепторы и снижающий нейродегенерацию при терапии болезни Альцгеймера. Было выявлено, что его хронический прием приводит к уменьшению морфологических повреждений и сохранению функций клеток Пуркинье и глии Бергмана мозжечка при спиноцереbellлярной атаксии 1 типа [1,2]. Также мемантин дополнительно применяется для ослабления тревожных расстройств [3], однако некоторые исследования утверждают обратных эффект [4].

Целью данной работы было оценить влияние блокатора NMDA-рецепторов — мемантина — на возникновение тревожности у здоровых мышей дикого типа.

В исследовании использовались мыши дикого типа трёхнедельного возраста. Исследуемая группа перорально принимала мемантин в течение 9 недель с расчётом 90 мг/кг.



А — схема приема мемантина и проведения теста «Ротарод». Сверху — контрольная, ниже — экспериментальная группа, получавшая мемантин (90 мг/кг) в течение 9 недель, начиная с 21 дня после рождения. Ниже представлен протокол проведения тестирования на вращающемся стержне «Ротарод»: в течение первых 3 мин — увеличение скорости с 0 до 30 об/мин, затем стабильна до 2 мин. Усредненные результаты времени удержания на вращающемся стержне представлены на графике (справа); (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); б — результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Слева направо: схема лабиринта; перемещение мышей в 1ый и 3ий день тестирования; график усредненных результатов времени нахождения мышей в закрытых рукавах лабиринта (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); в — результаты теста «Подвешивание за хвост». Левая диаграмма — эпизоды неподвижности, правая — период нахождения в неподвижном состоянии в течение 360 с (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Г. Данные записи пВПСП CA1 зоны вентрального гиппокампа групп мышей после одного (x1) стимула или десяти (x10) стимулов. Левая диаграмма —  $\tau$  пВПСП после десяти (x10) стимулов, правая — амплитуда пВПСП (\*\* $p < 0,01$ ). Белым — контроль, черным — экспериментальная группа

### Результаты

По результатам теста «Ротарод», здоровые мыши, длительно принимавшие мемантин, имеют снижение моторной активности и нарушение координации с третьего дня эксперимента. Данное явление может объясняться снижением двигательной памяти или же развитием тревожного расстройства на фоне побочных явлений мемантина (рис. а), для этого были проведены поведенческие тесты на тревожность.

Тестирования на тревожное поведение показали, что группа мышей, хронически принимавшая мемантин, демонстрирует ухудшение адаптации к ситуациям, вызывающим беспокойное поведенческое состояние в сравнении с контрольной группой. Третий день теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» демонстрирует увеличение времени нахождения в закрытых рукавах для мышей, принимавших мемантин. Избегание открытого пространства является признаком тревожного поведения (см. рисунок, б). Более выраженные изменения были выявлены при проведении теста подвешивания мыши за хвост (см. рисунок, в).

Электрофизиологическое исследование пВПСП срезов гиппокампа в вентральной СА1 зоне показало уменьшение амплитуды у мышей, принимавших мемантин ( $0,29 \pm 0,02$  мВ), по сравнению с контрольной группой ( $0,38 \pm 0,02$  мВ),  $p = 0,005$  (см.рис., г). Было выявлено, что при увеличении количества стимулов до 10, среднее  $\tau$  у группы мышей, принимавших мемантин, значительно больше ( $5,9 \pm 0,5$  мс<sup>-1</sup>), чем у группы контроля ( $4,2 \pm 0,3$  мс<sup>-1</sup>) и имеет статистически значимую разницу ( $p = 0,006$ ). На рис. (нижняя панель) приведена диаграмма для статистически значимых параметров: амплитуды и  $\tau$  пВПСП (см. рисунок, г).

### Литература

1. Akira Iizuka, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Hirai. Long-term oral administration of the NMDA receptor antagonist memantine extends life span in spinocerebellar ataxia type 1 knock-in mice // *Neurosci Lett*. 2015. V. 592. P.37–41.
2. Shuvaev A.N., Belozor O.S., Mozhei O.I. et al. Protective Effect of Memantine on Bergmann Glia and Purkinje Cells Morphology in Optogenetic Model of Neurodegeneration in Mice // *Int J Mol Sci*. 2021. V. 22. P. 15.
3. Schwartz T.L., Siddiqui U. A., Raza S. Memantine as an augmentation therapy for anxiety disorders // *Case Rep Psychiatry*. 2012. V. 2012. P. 749–796.
4. Rafia, A., Oryan S., Sahraei H., Eidi A. The Effect of Memantine Administration on Anxiety Maintenance in Stressed Male Wistar Rats // *Iranian Journal of Psychiatry and Behavioral Sciences*. 2019. V. 13, Iss. 41. je89526.

## THE GENOTYPE EFFECT ON STRIATAL-ENRICHED PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE (STEP) EXPRESSION IN RATS. BDNF MIMETIC GSB-106 INFLUENCE ON BEHAVIOR AND STEP IN AGGRESSIVE AND TAME RATS\*

V. S. Moskaliuk<sup>1</sup>, R. V. Kozhemyakina<sup>1</sup>, T. V. Ilchibaeva<sup>1</sup>,  
A. V. Tarasiuk<sup>2</sup>, A. V. Kulikov<sup>1</sup>, V. S. Naumenko<sup>1</sup>, E. A. Kulikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

<sup>2</sup>*Federal State Budgetary Institution Research Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow*

✉ v.moskaliuk@alumni.nsu.ru

### Abstract

Aggressive and tame rats differ by the level of STEP46 and BDNF proteins. In this study we have found that STEP46 in aggressive rats was higher, than in other strains of rats. The BDNF mimetic GSB-106 had an anti-aggressive effect. Aggressive rats had elevated protein level of STEP46, BDNF and proBDNF. GSB-106 did not affect these levels. Loud acoustic signals in the startle reflex test elevated the STEP46 protein level in the tame rats.

### Introduction

Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase STEP is associated with neurodegenerative disorders. STEP is present in the cell in two main isoforms: cytosolic STEP46 and transmembrane STEP61. Previously we have found that STEP is associated with fear-induced aggression in a rat model of genetically defined aggression towards human (aggressive rats) and its absence (tame rats). The cytosolic isoform STEP46 was elevated in aggressive rats compared to tame rats. However, as these strains were bred from wild Norway rats it is unknown whether STEP46 protein level was elevated or reduced during selection. Therefore, we compared these two strains of rats with classic laboratory strains Wistar and WAG. Moreover, STEP inhibitor reduced aggression and had an anxiolytic effect. STEP negatively correlates with Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which along with its precursor proBDNF is also elevated in aggressive rats. Therefore, we hypothesized a possible anti-aggressive action of BDNF low molecular weight mimetic GSB-106 (bis-N-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine hexamethylenediamide, Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow), which possesses neuroprotective and antidepressant-like activity (Gudasheva et al., 2012; Gudasheva et al., 2021; Vakhitova et al., 2021).

**The aim** of this study was to investigate the effect of different rat genotypes on STEP protein level and evaluate the effect of BDNF mimetic GSB-106 on the behavior and protein level of STEP, BDNF and proBDNF in the brain of aggressive and tame rats.

### Materials and Methods

The effect of different genotypes on the STEP protein level was investigated using the hippocampus of intact aggressive, tame, Wistar and WAG rats (n = 8 in each group). The effect of GSB-106 was investigated on aggressive (n = 30) and tame (n = 30) male rats. Animals were treated with GSB-106 (7 days, i.p., 0,5 or 1,5 mg/kg) or vehicle and behavior was measured in the glove and startle reflex tests. The STEP, BDNF and proBDNF protein levels were measured in the midbrain, frontal cortex, hippocampus, hypothalamus and amygdala using Western Blot analysis.

### Results

STEP46 in aggressive rats was significantly higher, than in tame rats and classic laboratory strains. GSB-106 reduced aggression of aggressive rats on the 3rd day of drug administration compared to the vehicle. Aggressive rats had a more profound reaction to acoustic signals in the startle reflex test compared to the tame ones; GSB-106 did not show any effect on the startle response. We found that the aggressive rats had elevated level of STEP46 and proBDNF compared to tame rats and an elevated level of BDNF in the frontal cortex and amygdala, which correlates with the previous findings. GSB-106 did not affect levels of the investigated proteins. The control group of tame rats in this experiment had a higher level of STEP46 protein, than in our previous work. We hypothesized, that the startle reflex test might have had an effect. To test this, we measured STEP46 protein level in the hippocampus of intact tame rats (n = 8) and tame rats (n = 8) after the test. We have found that the loud acoustic signals in the startle reflex test induced elevation of STEP46 protein level.

### Conclusion

Thus, in this study we have shown that aggressive rats have a higher STEP46 protein level compared to classic laboratory rat strains. Furthermore, STEP46 is elevated by the reaction to loud acoustic signals in the startle response test. GSB-106 had an anti-aggressive effect and did not affect protein levels of STEP, BDNF and proBDNF.

\* The study is supported by the Basic Research Project for a Young Researcher, grant number FWNR-2022-0010.

© V. S. Moskaliuk, R. V. Kozhemyakina, T. V. Ilchibaeva, A. V. Tarasiuk, A. V. Kulikov, V. S. Naumenko, E. A. Kulikova, 2022

## НАРУШЕНИЕ МИТОФАГИИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ И СТРАТЕГИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ\*

А. О. Моторина, М. С. Гавриш, Е. В. Митрошина, А. А. Бабаев

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

✉ a\_motorina99@mail.ru

### Аннотация

Болезнь Альцгеймера (БА) прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется значительной потерей когнитивных функций, памяти и расстройством суждения. Основными патологическими признаками БА являются наличие амилоидных ( $A\beta$ ) бляшек и нейрофибриллярных клубков, состоящих из агрегированных тау-белков. Накопление  $\beta$ -амилоида вызывает нарушение работы митохондрий, еще до отложения амилоидных бляшек и приводит к развитию окислительного стресса, что усиливает патогенез болезни. Удаление поврежденных митохондрий посредством митофагии является одним из перспективных направлений лечения болезни Альцгеймера.

Митофагия представляет собой избирательную форму аутофагии, при которой дефектные митохондрии специфически поглощаются аутофагосомами и подвергаются дальнейшей деградации в лизосомах. Митохондриальный груз распознается специфическими рецепторами и селективно затягивается в растущую аутофагосому. Это единственный клеточный путь, при котором из клетки удаляются целые митохондрии. В физиологических условиях митофагия играет существенную роль в поддержании митохондриального баланса и биогенезе, тем самым поддерживая клеточный гомеостаз. Активируясь в ответ на патологические стимулы, митофагия позволяет устранять дисфункциональные митохондрии и снизить влияние патологических процессов при БА или вовсе устранить их.

Целью данной работы оценить уровень экспрессии ключевых генов, принимающих участие в сборке специализированной аутофагосомы, при болезни Альцгеймера *in vitro*.

Для эксперимента использовали мышей линии 5xFAD. Культивировали кору головного мозга эмбрионов на 18 день пренатального развития. На 21DIV в культуры вносили модулятор митофагии. После инкубации из культур выделяли тотальную RNA, по матрице которой синтезировали cDNA, что использовали для постановки ПЦР в реальном времени. В рамках эксперимента оценивали уровни экспрессии митохондриальных структурных генов DRP1, OPA1 и Mfn2, аутофагических генов Sqstm1 и LC3B, и митофагического гена Pink1.

Через 40 минут после загрузки модулятора уровень экспрессии генов, ответственных за деление и слияние митохондрий, изменился в сторону деления. Уровень экспрессии аутофагических и митофагических белков уве-

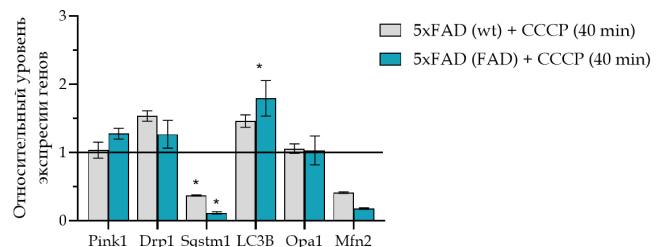


Рис. 1. Динамика экспрессии мРНК генов Pink1, Drp1, Sqstm1 и LC3B в первичных нейрональных культурах коры головного мозга мышей линий 5xFAD после внесения модулятора митофагии CCCP на 40 минут. Данные представлены в виде mean $\pm$ SEM. \* — статистическая значимость против интактного образца. Статистическая обработка по One-way ANOVA with Turkey's posttest

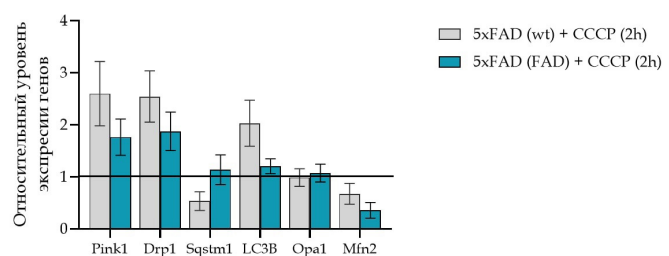


Рис. 2. Динамика экспрессии мРНК генов Pink1, Drp1, Sqstm1 и LC3B в первичных нейрональных культурах коры головного мозга мышей линий 5xFAD после внесения модулятора митофагии CCCP на 2 часа. Данные представлены в виде mean $\pm$ SEM. Статистическая обработка по Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test

\* Исследование поддержано НЦМУ «Центр фотоники» (соглашение с Министерством науки и высшего образования РФ No 075-15-2022-293).

личился, за исключение Sqstm1. Такие результаты свидетельствуют о начале фрагментации митохондриальной сети и сборке аутофагосом, однако притягивание груза в растущий фагофор не происходит из-за низкого уровня экспрессии Sqstm1 (рис. 1).

Через 2 часа после загрузки модулятора СССР наблюдается тенденция к началу фрагментации митохондриальной сети и сборке аутофагосом, с увеличением экспрессии белка Sqstm1 необходимого для притягивания груза. Однако этот процесс замедлен у FAD (рис. 2).

В результате оценки состояния митохондрий и митофагии после добавления 10 микроМ модулятора СССР через 40 минут по сравнению с интактами, было выявлено увеличение экспрессии основных генов мито- и аутофагии (Pink1, LC3B), что говорит об активации митофагии в культурах, полученных от мышей линии 5xFAD. При добавлении модулятора на 2 часа наблюдается противоположных эффект.

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В СОСТАВЕ АЭРОЗОЛЕЙ ЗАПАДНОСИБИРСКОГО РЕГИОНА\*

А. Д. Мошкин<sup>1</sup>, О. В. Охлопкова<sup>1</sup>, А. А. Маслов<sup>2,5</sup>, М. Ю. Карташов<sup>1</sup>, И. С. Андреева<sup>1</sup>, Б. С. Малышев<sup>1</sup>,  
Т. В. Трегубчак<sup>1</sup>, А. Н. Швалов<sup>1</sup>, Е. М. Астахова<sup>1</sup>, В. А. Терновой<sup>1</sup>, А. С. Сафатов<sup>1</sup>, Б. Д. Белан<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск

<sup>4</sup>Институт оптики атмосферы им. В. Е. Зуева СО РАН, Новосибирск

✉ alex.moshkin727@gmail.com

Атмосфера как воздушная оболочка планеты обеспечивает перемешивание и транспорт аэрозольных частиц из множества локальных, в том числе удаленных, источников биоаэрозолей (растительность, почва, водоемы, а также животные и человек). Естественно, что в процессе пробоотбора в зависимости от конкретных метеоусловий в пробу попадают аэрозоли, в том числе содержащие биологический материал, из различных регионов. Таким образом, отбор проб аэрозоля и дальнейшее изучение генетического материала в пробах дает возможность получить сведения о присутствии микроорганизмов, в частности вирусов, источники, которых находятся на значительной территории Российской Федерации. Соответственно, целью работы является изучение присутствия генетического материала вирусов в пробах атмосферного аэрозоля и оценка разнообразия этого генетического материала.

Летные экспедиции самолета-лаборатории производились в дневное время на высоте от 7000 м до 500 м. Отбор проб воздуха производился в импинджеры из нержавеющей стали, сорбция микроорганизмов из воздуха производилась в закрученный входящим потоком раствор Хэнкса в объеме 50 мл. Первая локация представлена трассой протяженностью примерно 50 км, проходящей над Караканским бором, расположенном на правом берегу реки Обь.

Помимо локации, представленной выше, сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора производился отбор проб у такого источника биоаэрозолей как Барсуковская пещера, которая является местом обитания рукокрылых. На момент отбора проб в пещере находились в состоянии спячки более 400 различных представителей отряда рукокрылых. Отбор образцов производился на фильтры с помощью портативного заборника.

Анализ биоаэрозолей производился с применением методов NGS секвенирования на платформе Illumina MiSeq. В результате идентификации последовательностей была получена информация о широком филогенетическом разнообразии в следующем соотношении: эукариоты — 43117 ридов (более 100 родов), бактерии — 5569 ридов (1196 родов), вирусы — 7979 ридов (домен d\_Viruses), бактериофаги — 21212 ридов (878 родов).

Общее количество прочитанных фрагментов вирусных частиц из отобранных проб атмосферного аэрозоля — 29191 рид (более 910 различных типов вирусов, включая бактериофаги). Были идентифицированы такие вирусы, как: Human mastadenovirus C (HAdV-C), Cercopithecine betaherpesvirus 5, Invertebrate iridescent virus 31, Only Syngen Nebraska virus 5, Chrysochromulina ericina virus, Chrysochromulina parva virus, Microplitis bicoloratus bracovirus, Pandoravirus inopinatum и другие.

Большинство ридов соответствующих вирусным агентам относились к бактериофагам, среди которых до вида идентифицировано 667 представителей. В рамках данного исследования были выявлены фаги, оказывающие негативное влияние на бактериальную составляющую микрофлоры человека: Faecalibacterium\_phage, Lactobacillus\_virus, Sequinquevirus, Skunavirus, Propionibacterium\_phage и другие.

Значительное количество обнаруженных вирусов (и фагов) в отобранных пробах в Барсуковской пещере (Новосибирская область) относятся к таким классам и подклассам, как: d\_Viruses|k\_Orthornavirae (103 рида), d\_Virusesk\_Orthornavirae\_Pisuviricota (102 рида), d\_Viruseso\_Caudovirales (177 ридов), d\_Virusesk\_Paramnavirae (39 ридов), d\_Virusesk\_Heunggongvirae (7 ридов). Общее количество прочитанных фрагментов вирусных частиц из отобранных проб — 1474 рид (более 20 различных типов вирусов, включая бактериофаги).

Таким образом, в 2021 г. в рамках работ по данному направлению проанализировано наличие фрагментов вирусных геномов в исследованных пробах. Вирусные геномы обнаружены во всех исследованных пробах. Накопление аналогичных данных в дальнейшем даст возможность отследить межгодовые и сезонные изменения разнообразия вирусных геномов в атмосфере. Полученные данные позволят более точно оценить «вирусный фон» атмосферы в регионе, что необходимо для понимания потенциальной опасности для человека присутствующих в атмосфере вирусов, также для выявления присутствия в атмосферном аэрозоле нехарактерных для региона микроорганизмов.

\* Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

## АНАЛИЗ ТРЕВОЖНО-ФОБИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ СИНДРОМА РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА\*

А. И. Муллакаева, А. Ф. Салихзянова, К. С. Богатова, О. В. Яковлева

*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

✉ adelya.may.of@gmail.com

### Аннотация

Синдром раздраженного кишечника (СРК) — это распространенное функциональное заболевание ЖКТ, характеризующееся висцеральной болью, нарушениями перистальтики и микрофлоры кишечника, переваривания пищи. У пациентов с СРК встречаются и не гастроэнтерологические симптомы: головная боль, мышечные и суставные боли, нарушение ночного сна, эмоциональные изменения.

Целью работы являлось выявление тревожно-фобических состояний у мышей с моделью хронического пост-воспалительного СРК, вызванной ректальным введением уксусной кислоты.

Животные в возрасте P10 (P — день после рождения) были случайным образом разделены на две группы: контрольную (n = 17) и опытную (n = 16) с вызванной моделью СРК. Мышам контрольной группы вводили хлорид натрия (NaCl — 0.9 %; 0,5 мл ежедневно для P10–P15 и 1 мл ежедневно для P16–P21). Для создания экспериментальной модели СРК мышам на P10 вводили раствор уксусной кислоты (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> — 1 %; 0,5 мл ежедневно для P10–P15 и 1 мл ежедневно для P16–P21). Для выявления тревожно-фобических состояний у мышей в возрасте P24–P26 и P38–P40 использовали тесты «Открытое поле», «Темно-светлая камера» и Интегральный показатель тревожности (ИПТ).

Анализ тревожности показал увеличение ИПТ у мышей обеих групп сразу после окончания моделирования СРК (P24). Но через 2 недели после моделирования в контрольной группе ИПТ снижался, в опытной группе показатели сохранялись на том же уровне.

Тест «Темно-светлая камера» показал увеличение времени, проведенного в светлой камере, для контрольной группы и снижение — для опытной. В тесте «Открытое поле» было выявлено увеличение числа актов груминга и дефекации у опытной группы по сравнению с контрольной.

Таким образом, мы можем утверждать, что модель хронического пост-воспалительного СРК приводит к усилению тревожно-фобического поведения мышей, что может быть связано с болью при введении уксусной кислоты в начале эксперимента и формированием хронического СРК в дальнейшем.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 22-25-20045.



## SINGLE-COPY EXPRESSION OF T CELL RECEPTORS' LIBRARY

R. V. Mungalov<sup>1</sup>, M. A. Turchaninova<sup>1,2</sup>, D. M. Chudakov<sup>1-3</sup><sup>1</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*<sup>2</sup>*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*<sup>3</sup>*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

✉ Mungalov.roman@yandex.ru

**Abstract**

Medical studies have been getting very great prospects for last two decades. With development of NGS sequencing, we have opened so many fields in such areas like human genetics, 3D-genomics, metagenomics, and so on. However, one of the most abundant fields in terms of new opportunities is molecular immunology. Indeed, the adaptive immune system, primarily originated in vertebrates, demonstrates unique features, have never been encountered in somatic cells. This is about V(D)J recombination mechanism followed by an amazing genetic diversity of immune receptors repertoire, capable for recognition and neutralization of virtually any theoretically possible antigen.

In our study, we are going to model natural biodiversity of T cell receptors' (later TCR) repertoire in order to profile the landscape of antigenic specificity using immunosequencing techniques and bioinformatical approaches (Glanville et al., 2017). We use CMV as a model antigen and its degenerated panel of immunodominant peptides in complex with MHC-dextramers (Dolton et al., 2015). On the other hand, we have an anti-CMV TCR and its library, degenerated by certain CDR3 positions (Tang et al., 2012) (Fig. 1). Power of this library is able to express about  $10^5$  various TCRs unique for each individual cell, thereby forming a natural repertoire.

Aiming the goal for each cell carrying a unique receptor, slightly different from one another in CDR3 loop, we designed pseudotyped lentiviral vectors and tittered them to achieve less, then 1 MOI units per cell, using non-CMV TCR as internal control (Kaur & Fang, 2020) (Fig. 2). We have also optimized a protocol of concentration of viral particles via ultracentrifugation and spinoculation with target cells. After these manipulations, we transduced a modified Jurkat cell line (Roskopf et al., 2018) (with knockout native TCR and inserted CD8 co-receptor necessary for MHC class I and TCR interaction) by optimal concentration of lentiviruses carrying the transgene of interest. We also made a positive control of the transduction efficiency as well as a viral particles assembly by using a viral system carrying GFP (Fig. 3).

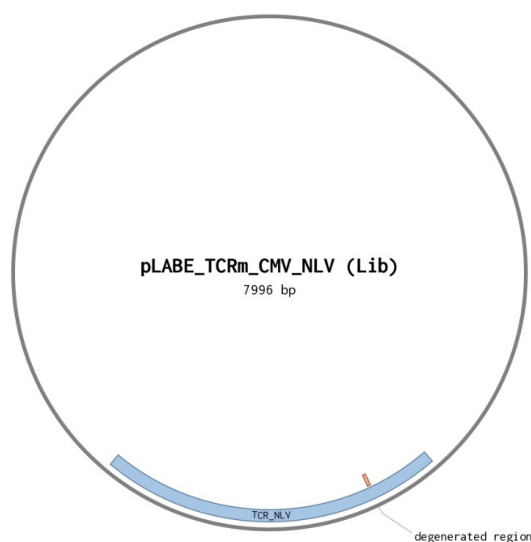


Fig. 1. Plasmid with degenerated CDR3

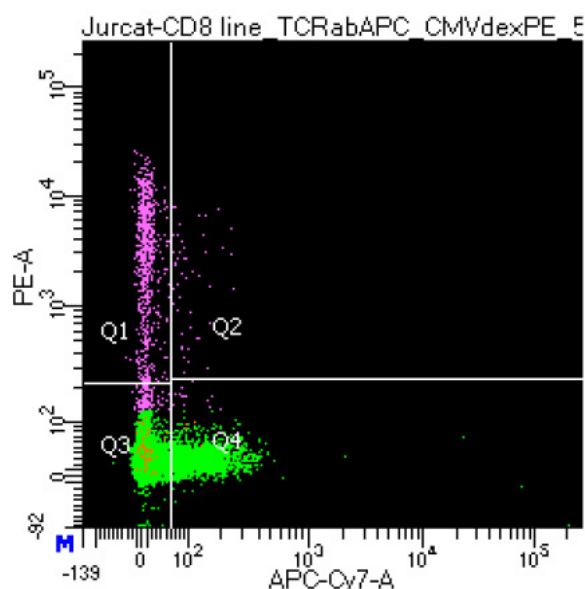


Fig. 2. Flow cytometry of Jurkat transduced by lentiviral particles in optimal titer: Q1 — TCR of interest stained by pMHC-dextramer; Q2 — double-positive cross-events, showing both TCRs per cell (~ 0.2 %); Q3 — no-TCR events; Q4 — non-CMV TCR stained by anti-abTCR (internal control)

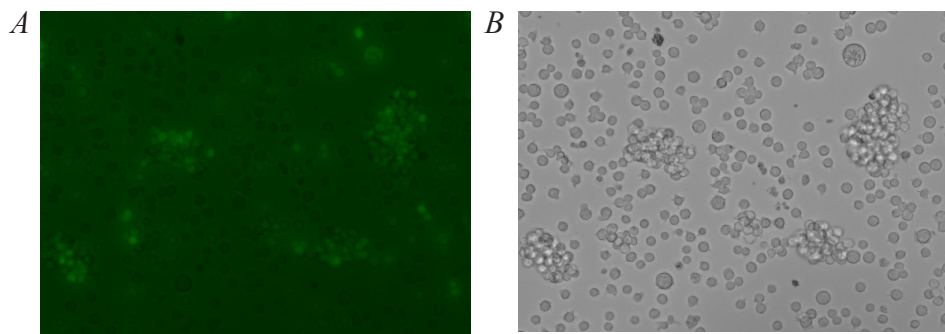


Fig. 3. Jurkat transduced by lentivirus carrying GFP (A) and background (B)

Finally, Jurkat cells were infected by optimal titer of lentiviral constructs carrying TCR with degenerated CDR3 followed by pMHC-dextramer staining and FACS (Fig. 4). We found the balance between the maximum number of cells expressed TCR and at the same time unique events of TCR administration on the cell surface. Thus, we have an transduction efficiency is about 15 % with about 70 % pMHC-dextramer positive events out of them.

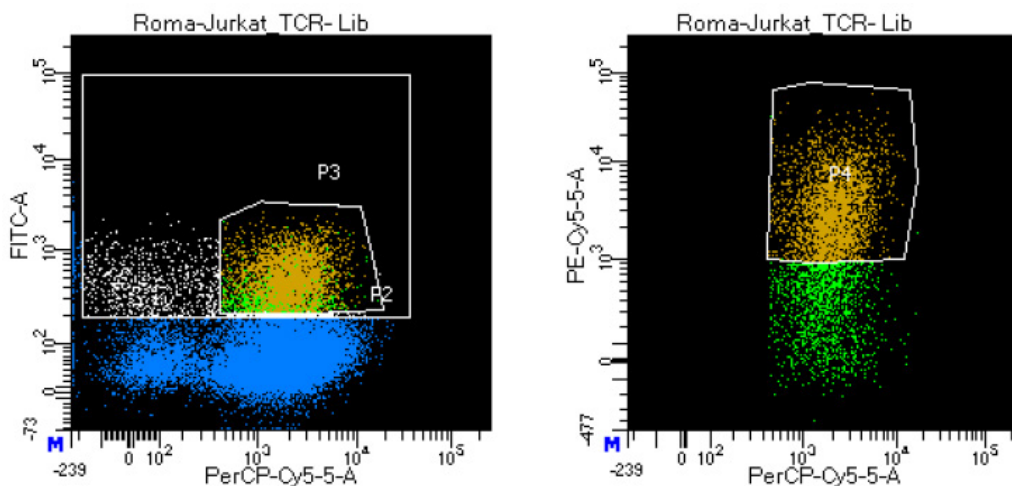


Fig. 4. FACS of pMHC-dextramer positive cells: P2 — CD3<sup>+</sup> cells (carrying TCR); P3 — CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells; P4 — CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> and pMHC-dextramer<sup>+</sup> cells

A key idea of our study is to compare positive (orange) and negative (green) populations (i.e. pMHC-dextramer<sup>+</sup> and pMHC-dextramer<sup>-</sup>) in order to get a biological sense of their difference at the sequence level. For this goal, we sorted both of these populations and made a cDNA library for Illumina followed by NGS on the MiSeq platform. These data are going to be analyzed, but we have already observed some major sequences, dominating over the rest TCR variants. It may indicate the presence of very specific variants of TCR to CMV antigen and the gradient of variants with the different specificity degree, including those with cross-reactive potential and thus autoimmune risk.

### Bibliography

1. Dolton, G., Tungatt, K., Lloyd, A., Bianchi, V., Theaker, S. M., Trimby, A., Holland, C. J., Donia, M., Godkin, A. J., Cole, D. K., Thor Straten, P., Peakman, M., Svane, I. M., & Sewell, A. K. (2015). More tricks with tetramers: A practical guide to staining T cells with peptide-MHC multimers. *Immunology*, 146(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/imm.12499>
2. Glanville, J., Huang, H., Nau, A., Hatton, O., Wagar, L. E., Rubelt, F., Ji, X., Han, A., Krams, S. M., Pettus, C., Haas, N., Arlehamn, C. S. L., Sette, A., Boyd, S. D., Scriba, T. J., Martinez, O. M., & Davis, M. M. (2017). Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature*, 547(7661), 94–98. <https://doi.org/10.1038/nature22976>
3. Kaur, A., & Fang, C.-M. (2020). Generation of stably expressing IRF5 spliced isoform in Jurkat cells. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.36877/pmmmb.a0000131>
4. Roskopf, S., Leitner, J., Paster, W., Morton, L. T., Hagedoorn, R. S., Steinberger, P., & Heemskerk, M. H. M. (2018). A Jurkat 76 based triple parameter reporter system to evaluate TCR functions and adoptive T cell strategies. *Oncotarget*, 9(25), 17608–17619. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24807>
5. Tang, L., Gao, H., Zhu, X., Wang, X., Zhou, M., & Jiang, R. (2012). Construction of “small-intelligent” focused mutagenesis libraries using well-designed combinatorial degenerate primers. *BioTechniques*, 52(3), 149–158. <https://doi.org/10.2144/000113820>

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГЕНА *ANT25* И ЕГО РОЛЬ В СИНТЕЗЕ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ И В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ\***М. А. Муханова<sup>1,2</sup>, И. В. Тоцкий<sup>1</sup>, О. Ю. Шоева<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ m.shishkina@g.nsu.ru

**Аннотация**

Ген *Ant25* обуславливает наличие проантоцианидинов (ПА) в зерне ячменя. Целью работы является молекулярно-генетическое картирование этого гена и установление его функциональной роли в биосинтезе ПА, а также в регуляции роста и развития растений ячменя. Показаны значимые различия в экспрессии генов биосинтеза ПА и ростовых параметров мутантных по гену *Ant25* растений в сравнении с диким типом.

Проантоцианидины представляют собой олигомерные флавоноидные соединения, относящиеся к классу растительных полифенолов. Благодаря антиоксидантной активности они выполняют защитные функции в жизни растений. Одновременно с этим показано их негативное влияние на усвоение корма и набор массы у сельскохозяйственной птицы, и на коллоидную стойкость пива. В связи с чем актуальным направлением селекции ячменя является получение сортов, у которых отсутствует или снижен биосинтез этих веществ. Шведскими генетиками в прошлом столетии была создана коллекция мутантов с нарушенным синтезом ПА и родственных им антоцианов, включающая 766 индивидуальных мутантов, которые с помощью тестов на аллелизм были сгруппированы в 30 групп комплементации, или локусов (Lundqvist, 2014). Неудачные попытки использовать в селекции беспроантоцианидиновых сортов мутанты, у которых мутации затрагивали гены основного пути биосинтеза флавоноидов, объясняются важностью этих соединений в росте и развитии растений (Dixon et al., 2005). Чтобы минимизировать негативные последствия от таких мутаций, были предприняты попытки использовать линии, в которых мутации затрагивали только синтез проантоцианидинов, тогда как синтез других флавоноидных соединений, включая антоцианы, не менялся, либо изменялся незначительно. К таким мутантам относится *ant25.264*, полученный на основе сорта Secobra 18193 с помощью химического мутагенеза. До настоящего времени локализация локуса *Ant25* в геноме ячменя была не известна.

В ходе выполнения исследования с помощью массового сегрегационного анализа и молекулярно-генетического картирования была показана локализация гена *Ant25* на коротком плече хромосомы 6Н между маркерами, фланкирующими район, протяженностью 6.6 Мб.

Для определения функциональной роли гена *Ant25* в биосинтезе ПА проводился анализ транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты общего фенилпропаноидного (*Pal*, *C4h*, *4Cl*) и флавоноидного (*F3h* и *Lcr*) путей биосинтеза полифенолов в зерне у мутанта *ant25.264* и сорта Secobra 18193. Для этого выделяли РНК в трех повторностях из развивающегося колоса и зерна на ранней молочной и восковой стадиях спелости у мутанта *ant25.264* и сорта Secobra 18193. С помощью реакции обратной транскрипции на матрице выделенной РНК получили кДНК, которая далее использовалась для проведения ПЦР в режиме реального времени для оценки количественного содержания транскриптов этих генов. По полученным данным, на ранней молочной стадии спелости отмечается значимое снижение экспрессии гена *Pal*, а на восковой — гена *C4h* у мутанта по сравнению с родительским сортом. Эти гены кодируют ферменты общего фенилпропаноидного пути биосинтеза. Также на этих стадиях снижена транскрипционная активность генов *F3h* и *Lcr*. А вот отличий в экспрессии гена *4Cl* не обнаружилось. Для фактора транскрипции проантоцианидинов *Ant28 (R2R3-Myb)* наблюдается снижение экспрессии только на первой стадии. По мере созревания ячменя экспрессия этого гена у мутанта восстанавливается до уровня контрольного образца – сорта секобра и значимых отличий между мутантом и родительским сортом в уровне экспрессии этого гена уже нет.

С помощью сравнительного структурного анализа было показано, что сорт Secobra 18193 по массе корня, массе побега, количеству боковых побегов и массе зерна с растения значимо превосходил мутант *ant25.264* ( $p < 0,05$ , *U*-тест), однако по длине главного побега значимых различий между мутантом и его родительским сортом не наблюдалось. Полученные результаты указывают на то, что ген *Ant25* не только участвует в регуляции синтеза проантоцианидинов в зерне ячменя посредством активации транскрипции структурных генов биосинтеза, но также имеет плейотропный эффект на рост и развитие растений ячменя.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №21-76-10024.

© М. А. Муханова, И. В. Тоцкий, О. Ю. Шоева, 2022

## ПОЛУЧЕНИЕ ANTI-CD87 CAR T-ЛИМФОЦИТОВ И ОЦЕНКА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

М. В. Неклесова

НЦМУ «Центр персонализированной медицины» НМИЦ  
им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург  
Санкт-Петербургский государственный университет

✉ neklesova.m@mail.ru

### Аннотация

Поиск антигенов, специфичных для злокачественных клеток — один из важнейших этапов при разработке эффективного противоопухолевого препарата. Поверхностный белок CD87 является потенциальной мишенью для адоптивной иммунотерапии многих типов злокачественных новообразований — как солидных, так и гематологических. В данной работе были исследованы цитотоксические свойства лимфоцитов с химерным антигенным рецептором к белку CD87.

В настоящее время наряду со стандартными методами лечения онкологических заболеваний активно развивается CAR T-клеточная терапия, показавшая впечатляющие результаты при лечении В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. Для эффективной элиминации опухолевых клеток и снижения вероятности возникновения побочных эффектов необходимо применение CAR T-лимфоцитов, нацеленных на специфичный опухолевый антиген. Таким кандидатом является поверхностный белок CD87, повышенная экспрессия которого коррелирует с подвижностью, способностью к инвазии и метастазированию злокачественных клеток [1] при колоректальном раке, остром миелоидном лейкозе, меланоме, раке легких, молочной и поджелудочной желез, простаты [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Возможная гиперэкспрессия CD87 в ассоциированном с опухолью стромальном микроокружении [8] может усилить противоопухолевый эффект CAR T-лимфоцитов.

Данная работа направлена на *in vitro* исследование цитотоксических свойств лимфоцитов с химерным антигенным рецептором к белку CD87. В ходе работы использовались две клеточные линии HeLa — контрольная и модельная-гиперэкспрессирующая CD87, причем экспрессия данного гена различалась в  $10^5$  раз. Для получения анти-CD87 CAR T-лимфоцитов проводилось выделение T-лимфоцитов из периферической крови здорового донора, их активация магнитными частицами DynabeadsHumanT-activatorCD3/CD28 (Invitrogen, США), культивирование и последующая лентивирусная трансдукция. Функциональное состояние CAR T-клеток оценивалось с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на INF- $\gamma$ , а также проточной цитофлуориметрии. Для анализа цитотоксической активности CAR T-лимфоцитов использовалась система анализа клеток в реальном времени xCELLigence Biosensor RTCA (Agilent Technologies, США). Проводилась инкубация эффекторных клеток (CAR T-лимфоцитов) с клетками-мишенями (не модифицированные клетки HeLa и HeLa-CD87 гиперэкспрессант).

По результатам ИФА концентрация INF- $\gamma$  в среде после сокультивирования CAR T-лимфоцитов и клеток-мишеней оказалась значимо выше, чем в контрольных образцах (рис. 1). Согласно анализу на проточном цитоме-

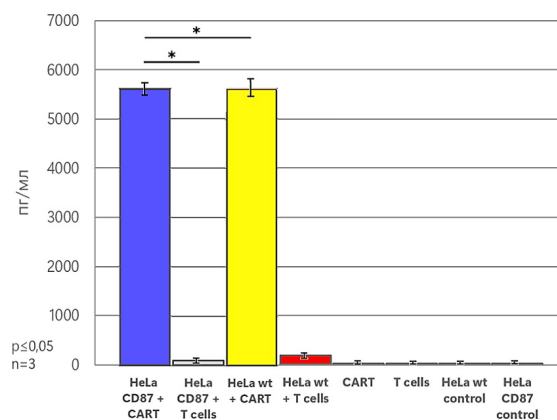


Рис. 1. Результаты иммуноферментного анализа: 1–4 — концентрация INF- $\gamma$  в среде после сокультивирования T- и CAR T-лимфоцитов с клетками-мишенями; 5–8 — концентрация INF- $\gamma$  в среде контрольных образцов

тре, практически все CAR T-лимфоциты имели маркеры активации CD27 и/или CD28. Вместе с этим, в популяции CAR T-клеток наблюдалась повышенная экспрессия маркера истощения — PD1 (20,66 %), практически 100 % фенотип T-клеток центральной памяти и соотношение Т-хелперы(CD4<sup>+</sup>):Т-киллеры(CD8<sup>+</sup>) = 1:7.

RTCA-анализ показал, что полученные CAR T-лимфоциты, в отличие от не трансдуцированных T-лимфоцитов, проявляют специфическую и выраженную спустя 20 часов цитотоксичность по отношению к клеткам как оверэкспрессирующей, так и не модифицированной клеточных линий HeLa (рис. 2). Причем цитотоксичность CAR T-клеток по отношению к линии HeLa с оверэкспрессией CD87 не оказалась значительно выше, чем в контрольной клеточной линии (рис. 3), что не исключает возможность off-target эффекта при применении CAR T-клеточного препарата *in vivo*.

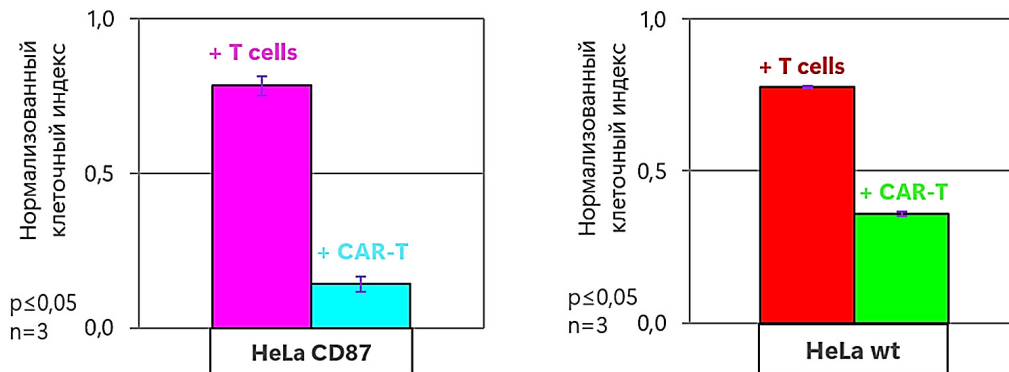


Рис. 2. Сравнительные диаграммы цитотоксичности CAR T- и T-лимфоцитов через 20 часов после добавления к клеткам-мишеням на основании изменения клеточного индекса

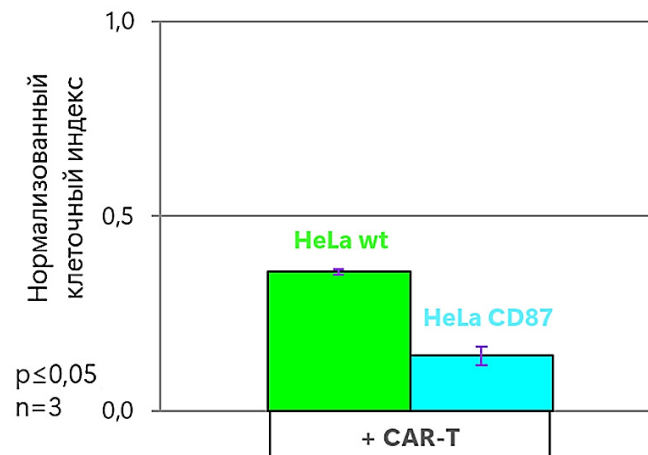


Рис. 3. Значение клеточного индекса через 20 часов после добавления к клеткам-мишеням CAR T-лимфоцитов

Таким образом, CD87 может использоваться в качестве антигена-мишени для противоопухолевой терапии с использованием T-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором ввиду их доказанной *in vitro* цитотоксичности. Однако, учитывая возможность off-target эффекта, изученный CAR T-препарат нуждается в оценке профиля безопасности *in vivo*.

### Литература

1. Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 23–36.
2. Gorantla B, Asuthkar S, Rao JS, et al. Suppression of the uPAR-uPA system retards angiogenesis, invasion, and *in vivo* tumor development in pancreatic cancer cells // *Mol Cancer Res.* 2011. V. 9. P. 377–389.
3. Amor C, Feucht J, Leibold J, et al. Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies // *Nature.* 2020. V. 583. P. 127–132.
4. Kusch A., Gulba D. Die Bedeutung des uPA/uPAR-Systems für die Entwicklung von Arteriosklerose und Restenose // *Z Kardiol.* 2001. V. 90. P. 307–318.
5. Laurenzana A, Chillà A, Luciani C, et al. uPA/uPAR system activation drives a glycolytic phenotype in melanoma cells // *Int J Cancer.* 2017. V. 141. P. 1190–1200.

6. Ahmad A, Kong D, Sarkar SH, et al. Inactivation of uPA and its receptor uPAR by 3,3'-diindolylmethane (DIM) leads to the inhibition of prostate cancer cell growth and migration // J Cell Biochem. 2009. V.107. P. 516-527.

7. Fox SB, Taylor M, Grondahl-Hansen J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. J Pathol. 2001;195(2):236-243.

8. Boonstra, M.C., et al., Expression of uPAR in tumor-associated stromal cells is associated with colorectal cancer patient prognosis: a TMA study // BMC Cancer. 2014. V. 14. P. 269.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ КАРДИОМИОПАТИЙ, ВЫЗВАННЫХ ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ ТРОПОМИОЗИНА\*

В. В. Нефёдова<sup>1</sup>, А. М. Кочурова<sup>2</sup>, А. М. Матюшенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

✉ viktoriya-neff@mail.ru

### Аннотация

Изучение механизмов развития наследственных заболеваний сердечной мышцы, таких как кардиомиопатии, является актуальной задачей ввиду широкой распространенности этих заболеваний. Исследования на молекулярном уровне способны помочь при выборе стратегии лечения данных патологий. В работе было проведено изучение влияния кардиомиопатических мутаций в гене *Trpm1.1* как на структуру и свойства белка, так и на его способность к регуляции мышечного сокращения.

Различные патологии скелетной и сердечной мышцы, в том числе наследственные (миопатии и кардиомиопатии) связаны с мутациями в генах тропомиозина (*Trpm*). Совместно с тропониновым комплексом (*Tn*) *Trpm* играет ключевую роль в кальциевой регуляции сокращения скелетной и сердечной мышц. Молекулярный механизм развития различного вида кардиомиопатий чрезвычайно сложен и до сих пор интенсивно изучается. Одной из общих черт развития кардиомиопатий является изменение кальциевой чувствительности мышечного сокращения. Поэтому в настоящей работе мы сконцентрировались на том, как мутации M8R, K15N, A277V (приводят к дилатационной кардиомиопатии) и M281T, I284V (вызывают гипертрофическую кардиомиопатию) в сердечной изоформе *Trpm1.1* влияют на работу системы тропомиозин-тропониновый комплекс, во многом отвечающей за кальциевую регуляцию мышечного сокращения. В работе были использованы следующие методы: искусственная подвижная система (ИПС), вискозиметрия, соосаждение и др.

Тропониновый комплекс состоит из трех субъединиц (*TnT*, *TnI* и *TnC*), при этом именно *TnT* является основным партнером *Trpm*. С использованием метода вискозиметрии нами было показано, что *TnT* значительно стабилизирует междимерные взаимодействия *Trpm*. В свою очередь, это приводит к увеличению аффинности тропомиозина к актиновому филаменту, что способствует восстановлению аффинности большинства мутантных *Trpm* к фибриллярному актину (за исключением *Trpm1.1* M8R). В искусственной подвижной системе в присутствии полного тропонинового комплекса были измерены  $pCa_{50}$  и максимальная скорость движения тонкого филамента в присутствии *Trpm* WT и мутантов. Для большинства мутантных форм изменения в  $pCa_{50}$  соответствовали фенотипу вызываемой ими кардиомиопатии, к примеру, для гипертрофических мутантов M281T и I284V *Trpm* было показано увеличение кальциевой чувствительности. Особое внимание мы обратили на мутацию M8R. *Trpm* M8R приводил к существенному снижению максимальной скорости перемещения регулируемых филаментов в ИПС, однако, не приводил к изменению  $pCa_{50}$ . Любопытно отметить, что эксперименты в ИПС, проведенные с использованием специфичных сердечной и скелетной изоформы *Tn*, показали, что тканевая специфичность изоформ *Tn* может являться основной причиной развития кардиомиопатии, ассоциированной с мутацией M8R в *Trpm*. Так, мутантный белок M8R *Trpm1.1* в присутствии сердечного *Tn* демонстрировал способность к регуляции сокращения, а в присутствии скелетного *Tn* полностью ее терял.

Таким образом, результаты, полученные в ИПС, демонстрируют, что все мутанты *Trpm1.1* в присутствии *Tn* могут регулировать подвижность тонкого филамента в присутствии  $Ca^{2+}$ , однако параметры  $pCa_{50}$  и  $V_{max}$  значительно отличаются, что, в конечном итоге, может приводить к негативным последствиям и развитию сердечных заболеваний.

В результате работы было показано, что в значительной степени тропониновый комплекс и, в частности, тропонин T определяют развитие кардиомиопатий, вызванных мутациями *Trpm*, что делает *Tn* перспективной мишенью для терапии кардиомиопатий.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ МК-1772.2022.1.4.  
© В. В. Нефёдова, А. М. Кочурова, А. М. Матюшенко, 2022

## ОБНАРУЖЕНИЕ ШТАММА *YERSINIA PESTIS* БИОВАРА *INTERMEDIUM* НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

К. А. Никифоров

*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов*

✉ Nikiforov666666@mail.ru

### Аннотация

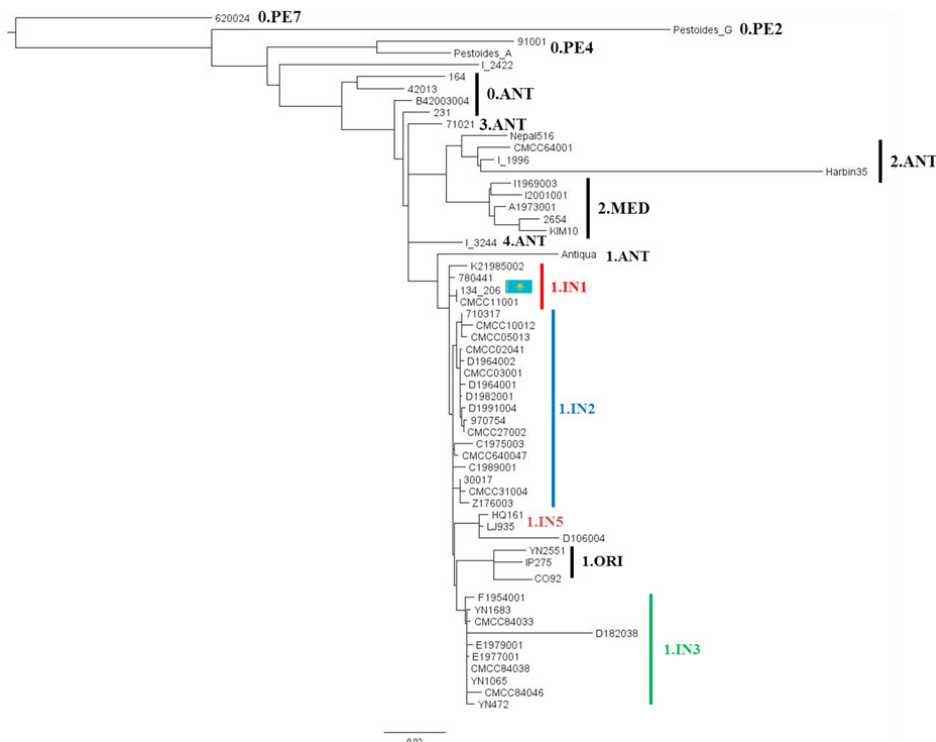
Впервые обнаружен штамм биовара *intermedium* основного подвида *Y. pestis* на территории республики Казахстан.

На территории Казахстана выделяют 20 природных очагов чумы, из которых два — трансграничные с РФ. Приграничные территории с Китаем занимают Приалакольский низкогорный, Джунгарский высокогорный и Илийский межгорный природные очаги. В большинстве природных очагов Казахстана циркулируют штаммы филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара основного подвида.

Штаммы биовара *intermedium* (1.IN) основного подвида характерны только для Китая. Штаммы ветви 1.IN1 циркулируют в провинции Цинхай и Синьцзян-Уйгурском автономном районе; 1.IN2 — в провинциях Цинхай, Ганьсу и Тибетском автономном районе; штаммы 1.IN3 — в провинции Юннань; штаммы 1.IN4 в северной части Синьцзян-Уйгурского автономного района; штаммы 1.IN5 — в провинции Юннань.

В РосНИПЧИ «Микроб» в результате работы по внутривидовому типированию штаммов *Y. pestis* было установлено, что штамм 134(206), выделенный в Илийском межгорном очаге, не относился к характерной для очага ветви 2.MED1. Для выяснения внутривидовой принадлежности штамма 134(206) было выполнено его полногеномное секвенирование и проведен филогенетический анализ с использованием 58 полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей. Филогенетический анализ и построение дендрограммы проводили по алгоритму Maximum Likelihood на основе обнаруженных 1730 коровых SNPs.

Анализ дендрограммы показал, что штамм 134(206) вошел в группу штаммов 1.IN1, характерную для провинции Цинхай и Синьцзян-Уйгурского автономного района Китая (см. рисунок). Штамм *Y. pestis* 134(206) представляет собой первый известный случай описания штаммов биовара *intermedium* на территории Казахстана.



Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 1.IN на основе выявленных. Алгоритм Maximum Likelihood, программа PhyML 3.1, модель HKY85



В качестве возможных предположений, объясняющих принадлежность штамма 134 (206) из Илийского межгорного очага Казахстана к филогенетической линии 1.IN1, можно выдвинуть две гипотезы: занос с территории Китая из Синьцзян-Уйгурского автономного района, занимающего приграничное положение с Казахстаном; либо наличие трансграничного природного очага, объединяющего территорию Илийского межгорного очага и расположенные рядом зоны природной очаговости Китая. Занос штамма из Китая был возможен либо через восточную часть Кульджинской равнины, либо через Джунгарские ворота — горный проход между Джунгарским Алатау с запада и хребтом Барлык с востока, соединяющий Балхаш-Алакольскую котловину на территории Казахстана и Джунгарскую равнину в Китае.

Таким образом, нами проведен филогенетический анализ с использованием штаммов основных линий эволюции *Y. pestis* и установлено, что штамм 134(206) относится к линии 1.IN1 биовара *intermedium*. Это свидетельствует о необходимости более детального эпизоотологического и эпидемиологического исследования этих территорий для паспортизации природных очагов Казахстана и Китая.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОРТИНГА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ FRET-БИОСЕНСОРОВ\*

Д. С. Новикова, А. А. Пожарский, А. Сагайдак

НИИ «Молекулярная фармакология»,  
Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

✉ dc.novikova@gmail.com

### Аннотация

Клеточные тест-системы на основе FRET-биосенсоров находят широкое применение при исследовании различных клеточных процессов и функционирования ферментов. В частности, использование FRET-биосенсоров активности АМФК является более экономичным и корректным инструментом для оценки киназной функции фермента. В работе описан способ повышения эффективности клеточной тест-системы на основе репортерной конструкции АВКАR методом клеточного сортирования.

Интерес исследователей к изучению функционирования АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) является неизменным в связи с большим терапевтическим потенциалом модулирования ее активности при различных патологических состояниях. Однако инструментов, позволяющих провести оценку киназной активности, не так много, и большинство из них представляют собой измерение опосредованных каталитической функцией характеристик.

Для непосредственной оценки киназной активности АМФК, Tsou et al. разработали флуоресцентный репортер активности АМФК на основе FRET-эффекта [1]. В качестве флуоресцентной составляющей была использована классическая пара белков YFP/CFP. Оптимизация разработанного конструктора позволила получить более эффективную репортерную систему, содержащие усовершенствованные версии флуоресцентных белков [2]. Использование клеток постоянно экспрессирующих подобную систему является и более экономичным инструментом для оценки активности АМФК, по сравнению с вестерн-блоттингом, и более корректным, так как данная репортерная система непосредственно отражает киназную активность фермента.

При создании клеточных тест-систем на основе флуоресцентных маркеров, в частности FRET-конструкций, мы столкнулись с рядом трудностей. Одна из них связана с низким уровнем трансфекции генетического материала, кодирующего FRET-биосенсор. В случае FRET-эффекта это становится критичным, так как эффективность переноса энергии сама по себе невелика и убывает с расстоянием между объектами как  $r^{-6}$ . Кроме того, по мере использования клеточной тест-системы происходит существенная деградация конструкции и падение светимости. В связи с этим возникала частая необходимость повторных трансфекций.

Чтобы преодолеть обозначенные трудности, мы предложили использовать метод клеточного сортирования. Для этого клетки линии H1299 трансфицировали плазмидой pcDNA3-ABKAR (Addgene plasmid #140051) с использованием набора для трансфекции FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) с последующей селекцией на генетине (G418). Получение обогащенной клеточной культуры проводили при помощи сортера SE3 (Bio-Rad). Отбор клеток осуществлялся гейтированием по прямому и боковому светорассеянию, а также уровню флуоресценции в канале 525/30 нм, соответствующем максимуму испускания белка YFP, входящего в структуру FRET-биосенсора. В результате проведенного сортирования была получена клеточная линия, в которой более 98 % клеток экспрессируют репортерную плазмиду, что было подтверждено с использованием имиджинговой системы Operetta (Perkin Elmer). Следует отметить, что данный подход позволяет отобрать клетки с высоким уровнем экспрессии конструкции, что существенно повышает статистическую значимость получаемых результатов.

### Литература

1. Tsou P., Zheng B., Hsu C.-H., Sasaki A.T., Cantley L.C. A fluorescent reporter of AMPK activity and cellular energy stress // Cell Metabolism. 2011. V. 13. P. 476–486.
2. Miyamoto T., Rho E., Sample V., Akano H., Magari M., Ueno T., Gorshkov K., Chen M., Tokumitsu H., Zhang J., Inoue T. Compartmentalized AMPK signaling illuminated by genetically encoded molecular sensors and actuators // Cell Reports. 2015. V. 11. P. 657–670.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ №21-73-00296.  
© Д. С. Новикова, А. А. Пожарский, А. Сагайдак, 2022

## BINARY ANTISENSE CONSTRUCTS MODULATED BY THE CONCENTRATION OF CANCER MARKERS

M. A. Y. Nour<sup>1</sup>, G. F. Kurbanov<sup>1</sup>, A. A. Eldeeb<sup>1</sup>, D. M. Kolpashchikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SCAMT Laboratory, ITMO University, St. Petersburg

<sup>2</sup>University of Central Florida, Orlando, USA

✉ moustapha@scamt-itmo.ru

### Abstract

Cancer is one of the world's deadliest diseases, murdering millions of people each year. Despite new detection and treatment technologies, the burden of cancer continues to rise. According to the American Cancer Society, more than 1.9 million new cases and 608,570 deaths in the United States alone in 2021. The new cancer treatment methods still suffer from low selectivity, off-target effect, and low efficiency. However, oligonucleotide gene therapy like antisense, DNzyme, and siRNA are come up as a promising therapeutic approach. This study is devoted to the development of a selective DNA technologies based on binary thresholder antisense that can be modulated by the concentration of cancer markers while cleaving another messenger RNA.

Antisense (ASO) is a complementary single-stranded DNA oligonucleotide to the target mRNA used to manipulate gene expression. The hybridization of the antisense to his target results in the formation of a heteroduplex, which attracts the RNase H enzyme, an endonuclease that catalyzes the cleavage of RNA in the heteroduplex. In general, there are three mechanisms for antisense used for therapeutic purposes: (1) RNase-H-dependent target mRNA degradation, (2) translation inhibition via steric block, and (3) RNA splicing modulation to regulate gene expression. We focused on RNase-H-dependent target mRNA degradation in this study.

The DNA constructs are based on binary antisense, consisting of an antisense strand split into two ASO-a, and ASO-b called Yes gate, each exhibiting two binding sites, and the binding sites are linked with a linker (HEG). The first site is bound by the mRNA target (GFP RNA-60), and the second is bound by the cancer markers (Kras). To recreate the antisense using the binary strands, one molecule of cancer markers must attach to the strands to hold them together. We designed and developed 2<sup>nd</sup> (ASO-Th-2i) and 3<sup>rd</sup> (ASO-Th-3i) gates binary thresholder antisense, which are only activated in high concentrations of cancer markers. Loops (one or two depending on the gates) act as inhibition systems to prevent the assembly of the two strands from recreating the antisense strand, to avoid the creation of the heteroduplex DNA|RNA

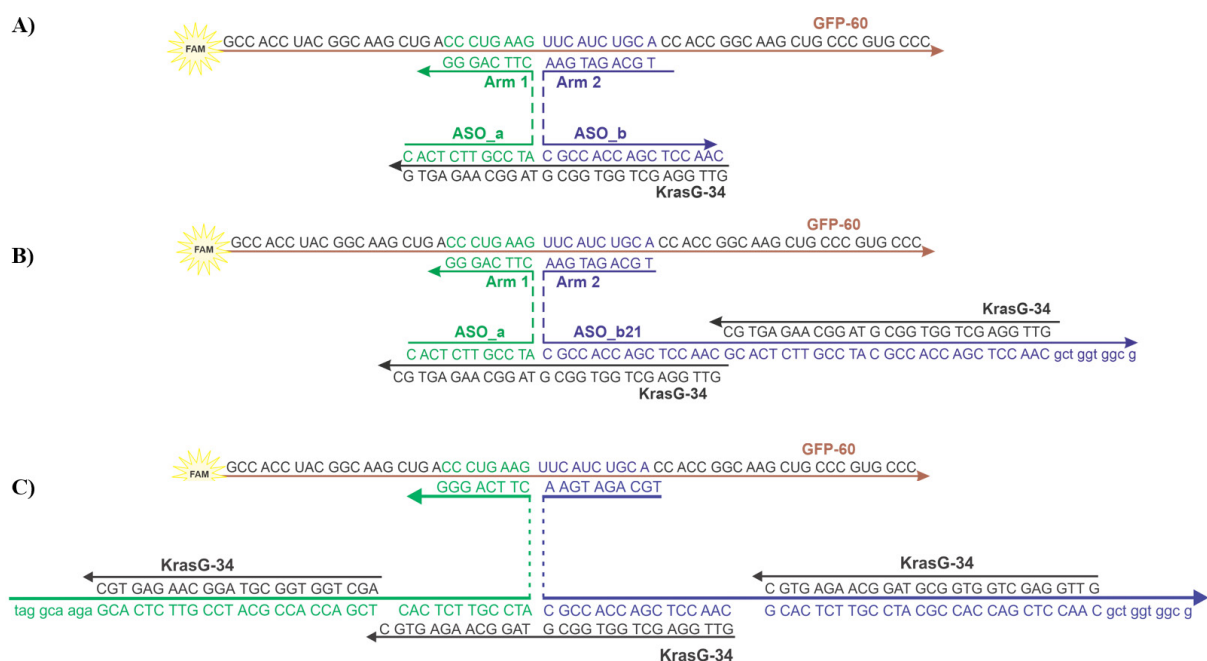


Fig. 1. Design of threshold binary antisense biASO, ASO-Th-2i and ASO-Th-3i gates. They require 1x, 2x and 3x times molecule of Kras to be fully activated. In the absence of input molecules, the additional input binding arm fold to create an inhibition system

that recruits RNase H. To be fully activated and rich, the highest cleavage 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> gates require 2 and 3 times the concentration of cancer markers compared to the antisense constructs.

According to the graph (see fig 2) shows that the Bi-ASO is activated in the minimal concentrations of cancer marker and then plateaus after reaching its highest percentage of cleavage. Followed by the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> gates that reach the most elevated cleavage at 2 and 3 times the concentration of cancer markers compared to the concentration of binary construct. The results of the graphs confirm the threshold system of our binary antisense.

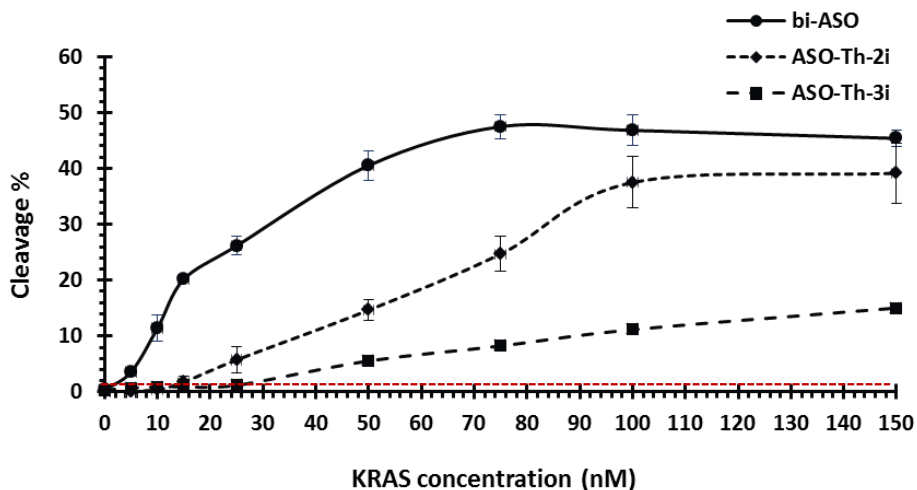


Fig. 2. The graph represents the quantification of gels using image-lab software.

The Data quantification and data average are values of three independent experiments. The red line is the threshold line which correspond to 3 standard deviations above the background and their intersection indicate the activation of each gate

## АНАЛИЗ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУБФРАКЦИЙ АНТИТЕЛ ПЛАЗМЫ КРОВИ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ\*

Е. И. Одегова, А. М. Тимофеева

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

✉ bezukaf@mail.ru

### Аннотация

В своем составе антитела содержат по две легкие цепи, которые делятся на два типа:  $\kappa$  (каппа) и  $\lambda$  (лямбда). В данной работе из крови доноров переболевших COVID-19 и/или вакцинированных Sputnik V выделены препараты IgG, которые фракционированы на  $\kappa\kappa$ -IgG,  $\kappa\lambda$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG. Проведен анализ способности выделенных антител гидролизовать различные субстраты, показано что  $\kappa\kappa$ -IgG в большинстве случаев обладают большей активностью, чем  $\kappa\lambda$ -IgG и химерные  $\kappa\lambda$ -IgG.

Известно, что IgG обмениваются HL-фрагментами, в результате чего образуются биспецифичные молекулы. Ранее из крови, молока и плаценты здоровых доноров, а также крови ВИЧ-инфицированных доноров, были выделены IgG, содержащие одновременно два типа легких цепей ( $\kappa\lambda$ -IgG). Цель данной работы заключалась в анализе каталитических активностей (ДНКазной, амилолитической и протеолитической) субфракций  $\kappa\kappa$ -IgG,  $\kappa\lambda$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG, выделенных из плазмы крови доноров, переболевших COVID-19 и/или вакцинированных препаратом Спутник V. В данное исследование включили четыре группы доноров по десять пациентов:

- группа I: переболевшие COVID-19 в 2020–2021 году и вакцинированные в начале 2021 года препаратом Спутник V;
- группа II: переболевшие COVID-19 в 2020–2021 году, невакцинированные;
- группа III: вакцинированные Спутником V в начале 2021 года;
- группа IV: невакцинированные доноры, не переболевшие COVID-19.

Образцы крови были собраны во время первой волны вируса (вариант Wuhan). В исследовании были отобраны доноры, не имеющие аутоиммунных патологий и хронических инфекций. Наличие или отсутствие перенесенного COVID-19 в анамнезе подтверждали иммуноферментным анализом антител к S- и N-белкам.

Из плазмы крови доноров каждой группы получены препараты IgG, показана их электрофоретическая и иммунологическая гомогенность. IgG разделены на сорбентах, специфически связывающих легкие цепи типа каппа и лямбда. Получено по 3 фракции антител для каждой группы доноров:  $\kappa\kappa$ -IgG,  $\kappa\lambda$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG.

Анализ ДНКазной активности выделенных фракций показал, что во всех группах доноров субфракция  $\kappa\kappa$ -IgG более активна в гидролизе ДНК по сравнению с  $\kappa\lambda$ -IgG.  $\kappa\lambda$ -IgG во всех группах доноров, кроме группы II обладают меньшей ДНК-гидролизующей активностью по сравнению с  $\kappa\kappa$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG. Анализ амилолитической активности фракций IgG показал, что в группах I–III доноров  $\kappa\lambda$ -IgG проявляют большую активность в гидролизе мальтогептаозы по сравнению с  $\kappa\kappa$ -IgG, а в группе IV активность  $\kappa\kappa$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG оказалась сопоставимой. Также показано, что  $\lambda\lambda$ -IgG в группах II–IV обладают меньшей амилолитической активностью по сравнению с  $\kappa\kappa$ -IgG и  $\kappa\lambda$ -IgG.

RBD является участком S-белка, ответственным за вход вируса в клетку. Анализ активности антител в гидролизе RBD данными фракциями антител показал, что в группе I и II активность в гидролизе RBD уменьшалась в порядке:  $\kappa\kappa$ -IgG >  $\kappa\lambda$ -IgG >  $\lambda\lambda$ -IgG, а в группе III:  $\kappa\lambda$ -IgG >  $\lambda\lambda$ -IgG >  $\kappa\kappa$ -IgG. Так как доноры группы IV группы не встречались с поверхностными антигенами SARS-CoV-2, закономерно, что их плазма крови не содержит анти-RBD-антител, и IgG не проявляют каталитической активности в гидролизе RBD.

Оценен вклад  $\kappa\kappa$ -IgG,  $\kappa\lambda$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG разных групп доноров в гидролиз 6 12-звенных олигопептидов, соответствующих эпитопам S-белка SARS-CoV-2:  $\kappa\kappa$ -IgG наиболее активны в гидролизе 4 из 6 исследованных олигопептидов,  $\kappa\lambda$ -IgG активно гидролизуют только один олигопептид, один из проанализированных олигопептидов гидролизуются антителами типа  $\kappa\lambda$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG.

Таким образом, показано что  $\kappa\kappa$ -IgG в большинстве случаев обладают большей активностью в гидролизе субстратов, чем  $\kappa\lambda$ -IgG и  $\lambda\lambda$ -IgG. Исключением является ряд случаев:  $\kappa\lambda$ -IgG проявляют большую амилолитическую активность во всех исследованных группах доноров, также  $\kappa\lambda$ -IgG более активны в гидролизе одного из шести исследованных олигопептидов. Полученные результаты могут быть использованы в разработке терапевтических моноклональных антител, для разработки антител с учетом их возможной каталитической активности.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 21-75-10105 (рук. Тимофеева А.М.).  
© Е. И. Одегова, А. М. Тимофеева, 2022

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИНАМИКА КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВЫХ МАТРИКСАХ

М. С. Онищенко<sup>1</sup>, Н. А. Швед<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Институт наук о жизни и биомедицины, Владивосток

<sup>2</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

✉ maronishchenko@gmail.com

### Аннотация

Понимание последовательности сигналов от рецептора к транскрипционному фактору и поведения клетки как нормальной, так и опухолевой в ответ на изменения внешних условий является краеугольным камнем современной медицины. Исследование в данной области в дальнейшем позволят создать эффективные инструменты влияния на пролиферацию, дифференцировку, жизнеспособность клеток, что в будущем может быть использовано как новые технологии противоопухолевой терапии.

Сигнальный путь RAS-RAF-MEK-ERK играет важную роль в управлении и контроле различными физиологическими процессами в клетках, например, рост, деление, апоптоз [1, 2]. Исследование ключевых моментов и тонкостей, приводящих к его ингибированию, является началом крупномасштабных проектов в области молекулярной биологии. Один из основных компонентов предлагаемого искусственного аналога внеклеточного матрикса — пектины. Они широко распространены в медицине и биотехнологии как биологически активные вещества, но, несмотря на свою популярность, влияние этих веществ на сигнальные пути малоизучено. Цель работы — оценить влияние пектиновых матриксов на сигнальный путь Ras-Raf-MEK-ERK, пролиферацию, синтез маркеров дифференцировки клеток глиомы С6.

В рамках эксперимента клетки линии С6 культивировали в течение 7 дней на пектиновых пленках со степенью этерификации (СЭ) 0 и 50, затем проводили вестерн-блоттинг на  $\beta$ -Actin, для идентификации активированных молекул ERK 1/2, GFAP и  $\beta$ -III Tubulin. Для оценки жизнеспособности проводили их количественную оценку с помощью конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентных маркеров.

Выравнивание концентраций белков контролировали с помощью антител к  $\beta$ -актину (рис. 1, а), анализ подтвердил, что каждый из анализируемых образцов в том числе и контрольные образцы, были специфически связаны с  $\beta$ -актином. Разброс интенсивности полос  $\beta$ -актина не наблюдалось.

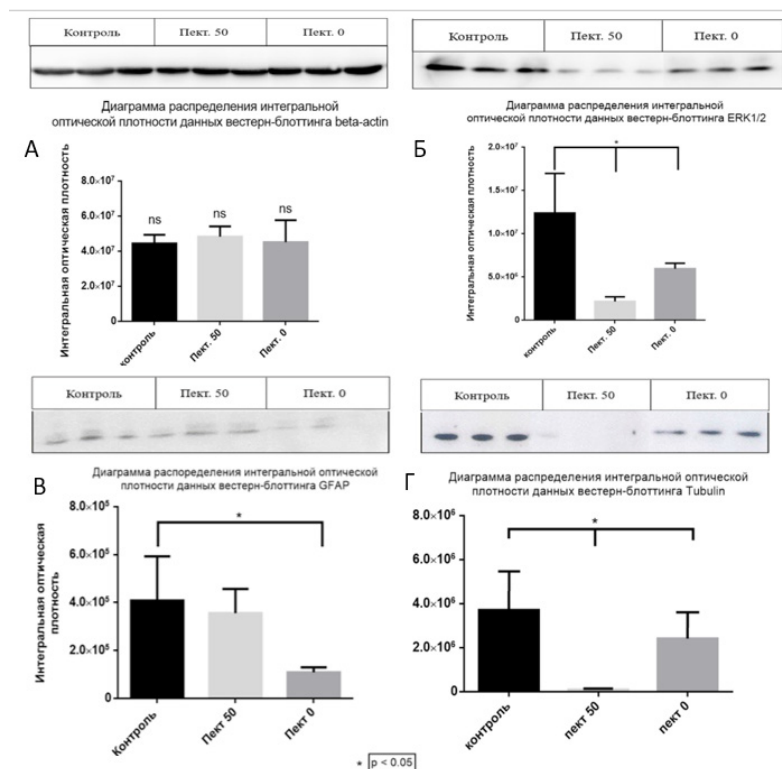


Рис. 1. Данные вестерн-блоттинга для: а —  $\beta$ -Actin; б — ERK 1/2; в — GFAP; г —  $\beta$ -III A Tubulin

В результате, методом вестерн-блоттинга оценено ингибирование сигнального пути Ras-Raf-MEK-ERK. Анализ вестерн-блоттинга показал, что образцы, культивируемые на пектиновых гидрогелях с разной степенью этерификации ингибировали сигнальный путь по сравнению с контролем, наибольшее ингибирование наблюдалось на пектине со СЭ 50 (рис. 1, б).

Клетки глиомы С6 культивируемые на пектине со степенью этерификации 0 значительно снижали содержание глияльного фибриллярного кислого белка (рис. 1в) по сравнению с другими образцами и контролем, а содержание  $\beta$ -III тубулина (рис. 1г) было значительно меньше в клетках глиомы С6 культивируемые на пектине со СЭ 50. Таким образом, различная модификация пектинов влияет на синтез маркеров дифференцировки;

Однако добавление активатора сигнального пути ERK-MAPK к клеткам глиомы С6, культивируемых на пектинах, повышают их пролиферативную активность, что свидетельствует о воздействии пектинов на ERK-MAPK (рис. 3). Селективный ингибитор и активатор в концентрации 10 мкМ не влияли на жизнеспособность глияльных клеток (рис 2 а, б, в).

Полученные данные изучения ингибирования сигнального пути будут востребованы для детального понимания механизмов активирования и ингибирования каскада реакций, а изучение взаимодействия клеток опухоли и ее микроокружения откроет широкие перспективы для диагностики и лечения онкологических заболеваний.

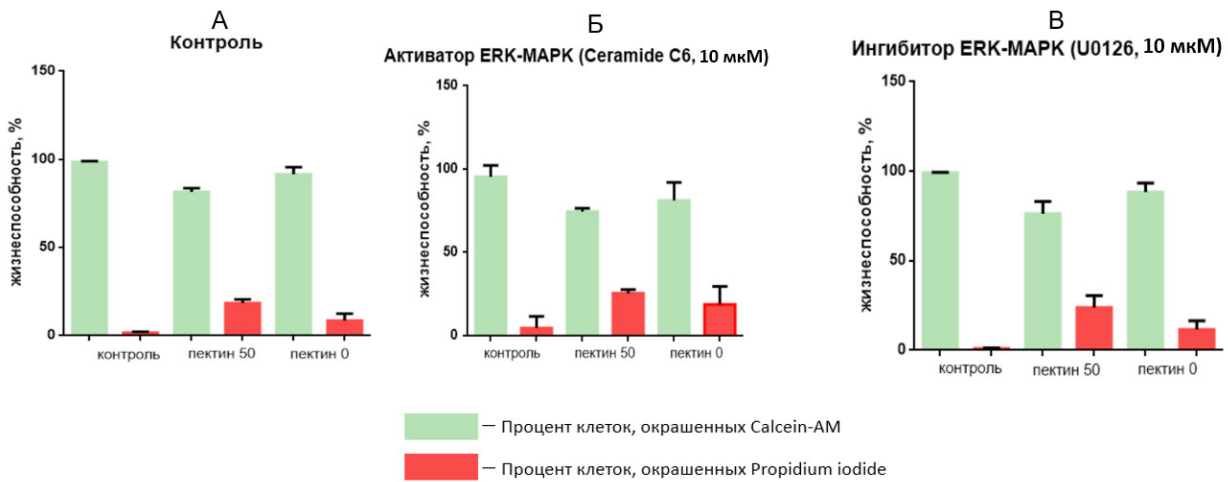


Рис. 2. Диаграммы оценки жизнеспособности для: а — контрольной группы; б — группы с добавлением активатора ERK-MAPK; в — группы с добавлением ингибитора ERK-MAPK

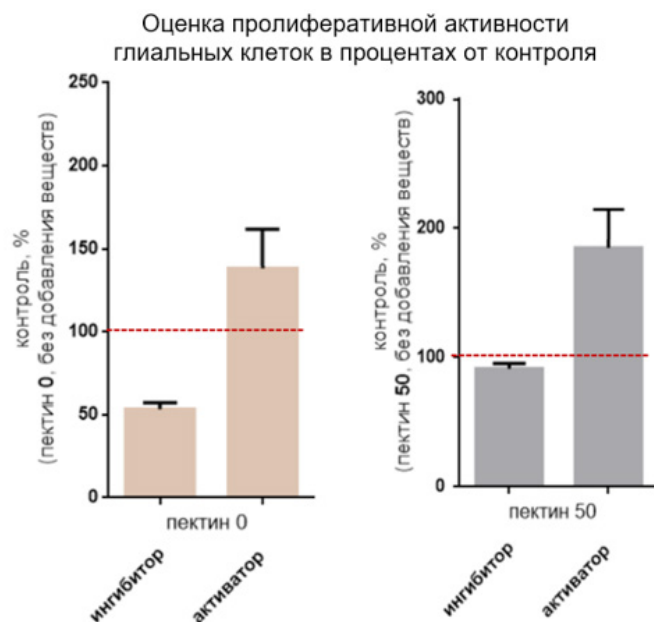


Рис. 3. График пролиферативной активности глияльных клеток, культивируемые на пектиновых матриксах с добавлением активатором и ингибиторов в процентах от контроля

Поскольку некоторые пектиновые гидрогели показали ингибирование синтеза важного во многих астроцитах и глиобластомах белка GFAP и бета-тубулина III, то дальнейшее изучение механизмов тонкой молекулярной регуляции позволит создать новый инструмент для терапии больных с опухолями глиального типа.

#### **Литература**

1. Yang, S. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma // *Oncological Lett.* 2017. V 13. P. 1041–1047.
2. Yan-Jun, G ERK/MAPK signaling pathway and tumorigenesis // *Experimental and therapeutic medicine.* 2019. V14. P. 1998–2007.



## ПРЕОДОЛЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ КАТИОННЫХ ПЕПТИДОВ

А. В. Онян, А. А. Рудакова, О. Г. Ковтун

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва

✉ anapaul@yandex.ru

### Аннотация

Исследована избирательная цитотоксичность катионных пептидов (КП) для чувствительных и резистентных к химиопрепаратам опухолевых клеток (ОК). Цитотоксичность обусловлена активацией каспаз 3, 8, 9 и p53-зависимым апоптозом, который индуцирован при взаимодействии КП с нуклеолином, гиперэкспрессированным на поверхности ОК, с последующей инактивацией шаперонных белков NCL и NPM.

### Введение

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток (ОК) — острая проблема при лечении онкологических заболеваний, т.к. ОК сохраняют жизнеспособность в ответ на любую комбинированную химиотерапию. Один из механизмов формирования МЛУ клеток к цитотоксическим агентам и радиации, связан с подавлением апоптоза путем активации рецепторов смерти (Fas) на поверхности клеток. Возможна инактивация внутриклеточного сигналинга и функций митохондрий, включая нарушение регуляции или супрессию антиапоптотических факторов Bcl-2, BCLX (L), Bfl1/A1 и др., а также инактивацию супрессора p53 и усиление экспрессии сурвивина, FLIP, NF-карбаВ. Ключевые регуляторы апоптоза и других важнейших клеточных функций — шаперонные белки нуклеолин (NCL) и нуклеофозмин (NPM), гиперэкспрессированные в ядрах опухолевых клеток, а NCL также на их поверхности. Инактивацию поверхностного NCL и внутриклеточных фракций NCL/NPM с индукцией гибели ОК можно рассматривать как новый подход к противоопухолевой терапии, позволяющей преодолеть приобретенную МЛУ ОК, включая и стволовые ОК.

### Цель работы

Характеристика катионных пептидов (КП) с дендритной структурой как лигандов NCL/NPM, инактивирующих эти белки с последующей гибелью ОК.

### Материалы и методы

Использованы: 1. Сублинии клеток рака молочной железы (РМЖ): исходной линии HBL-100, чувствительной к доксорубину, и HBL-100/Dox с резистентностью, приобретенной в процессе культивирования клеток в присутствии Dox; 2. Сублинии множественной миеломы: исходной линии RPMI 8226, чувствительной к бортезомибу, и резистентной RPMI 8226 Btz; контроль — культура фибробластов кожи человека H1036. Анализировали 7 КП с молекулярной массой около 2 кДа и зарядом от +2 до +14. Для оценки выживаемости клеток *in vitro* применяли МТТ-тест и специфичное окрашивание аннексином, пропиридиум иодидом и Хекст 3342. Для локализации пептидов и их возможных мишеней использовали меченый Су5 пептид и ИГХ-окрашивание клеток. С помощью проточной цитометрии и узкоспециализированных наборов оценены механизмы гибели ОК. Взаимодействие лиганд-мишень изучали с помощью вестерн-блоттинга и парного молекулярного докинга (программа Maestro).

### Результаты

1. Приобретенная резистентность клеток HBL-100/Dox к доксорубину связана с накоплением в клетках мембранного белка-транспортера Pgp, кодируемого геном MDR1, который активируется в ответ на действие химиопрепаратов. Помимо выброса из клетки препаратов, Pgp может функционировать как антиапоптотический белок, препятствуя активации каспаз. Трехсуточная инкубация чувствительных и резистентных клеток с тремя КП: NC783, AM-2 и конъюгированным с Dox пептидом KK13-Dox (0,5–4 мкг/мл) снижает их выживаемость до 18–25 % (и 4–6 % при концентрации 2–4 мкг/мл). Механизм гибели связан с активацией каспаз 3, 8 и 9, что указывает на апоптоз. В контроле выживаемость клеток после инкубации с КП осталась высокой (85–110 %).

2. Выживаемость клеток RPMI 8226 и производной резистентной сублинии с МЛУ в результате 3-суточной инкубации с КП снизилась до 12 % и 23 %, что также связано с апоптозом, активацией каспаз 3, 8, 9 и с аутофагией (~15 % клеток).

Таким образом, КП индуцируют избирательную гибель ОК независимо от гистологии опухоли путем активации апоптоза. Происходит взаимодействие КП с поверхностными молекулами NCL, подтвержденное докинггом, и транспорт КП с последующим проникновением в ядро и выходом ядерного NPM в цитоплазму. Этот процесс сопровождается ингибированием транскрипции ДНК, сборки рибосом, репарации двойных разрывов ДНК и других важных функций, а также высвобождением супрессора p53. В нормальных клетках уровень КП ниже за счет пассивного проникновения амфифильных КП через мембрану с последующим протеолизом несвязанных с клеточными мишенями пептидов. По результатам докинга, связь Pgp с КП слабее, чем взаимодействие NCL-КП (мишень-лиганд), поэтому выброс КП из ОК минимален. Исследованные КП перспективны также для транспорта в ОК препаратов, например Dox, усиливающих цитотоксичность пептидов для резистентных к терапии ОК.

## ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА 5-НТ7 РЕЦЕПТОРА В СРЕДНЕМ МОЗГЕ НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА BDNF И ЕГО РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ\*

А. С. Орешко, А. Я. Родный, Т. В. Ильчибаева, Д. В. Базовкина, В. С. Науменко

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

✉ a.shaburova@g.nsu.ru

### Аннотация

Изучено влияние сверхэкспрессии гена серотонинового 5-НТ7 рецептора в среднем мозге на поведение и экспрессию нейротрофического фактора мозга BDNF и его рецепторов у мышей на фоне длительного потребления этанола. Показано, что сверхэкспрессия гена 5-НТ7 приводит к повышенной тревожности мышей (вне зависимости от введения этанола), а также росту уровня белка pro-BDNF в структурах мозга только у мышей, потреблявших воду.

Серотониновая (5-НТ) нейромедиаторная система и нейротрофический фактор мозга BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) являются важнейшими факторами нейропластичности. Нарушение их функциональной активности может приводить к развитию психических болезней, при этом особую роль играет 5-НТ7 рецептор в связи с его участием в ауторегуляции 5-НТ системы мозга. Показано, что BDNF и 5-НТ мозга могут модулировать эффекты введения этанола.

В данной работе мы исследовали эффект введения в средний мозг самцов линии C57BL/6 вирусного конструкта «SynH1-2\_HTR7-EGFP», вызывающего сверхэкспрессию гена 5-НТ7 рецептора, на поведение и экспрессию BDNF и его рецепторов p75 и TrkB в модели хронической алкоголизации. Эксперименты проводили через 4 недели после введения конструкта на фоне потребления 10 % этанола (контрольные мыши пили воду). Поведение изучали в тестах «открытое поле», «темно-светлая камера», «принудительное плавание». Экспрессию генов оценивали в структурах мозга мышей методом ОТ-ПЦР реального времени. Уровень белков исследовали методом Western blot. Анализ данных проводили двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим анализом межгрупповых сравнений по Фишеру.

Не обнаружено различий между группами по двигательной активности животных, при этом мыши, потреблявшие этанол, демонстрировали повышенную тревожность ( $p = 0,0005$ ) и снижение депрессивноподобной неподвижности ( $p = 0,047$ ). Сверхэкспрессия гена 5-НТ7 рецептора не повлияла на депрессивноподобное поведение, но увеличила уровень тревожного поведения у мышей, получавших и воду ( $p = 0,019$ ), и этанол ( $p = 0,026$ ).

Алкоголизация привела к росту уровня экспрессии гена *Bdnf* в префронтальной коре ( $p = 0,0004$ ), а также к снижению уровня мРНК *Bdnf* в гиппокампе ( $p = 0,009$ ). Введение конструкта с геном 5-НТ7 рецептора только снизило уровень экспрессии гена *Bdnf* в префронтальной коре у мышей, получавших этанол ( $p = 0,020$ ).

Хроническая алкоголизация привела к увеличению уровня белка 5-НТ7 в среднем мозге ( $p = 0,0236$ ) и белка pro-BDNF (предшественника BDNF) в гиппокампе ( $p = 0,0191$ ). Сверхэкспрессия гена 5-НТ7 рецептора вызвала рост уровня белка pro-BDNF в среднем мозге ( $p = 0,0052$ ), коре ( $p = 0,0202$ ) и гиппокампе ( $p = 0,0082$ ) у мышей, получавших воду. Не было выявлено изменений в содержании белков BDNF и его p75 и TrkB рецепторов в структурах мозга мышей всех групп.

Таким образом, и алкоголизация, и сверхэкспрессия гена 5-НТ7 рецептора приводят к развитию тревожного поведения, при этом этанол подавляет у мышей повышение уровня белка-предшественника нейротрофического фактора мозга (pro-BDNF), обусловленное сверхэкспрессией гена 5-НТ7 рецептора.

\* Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№22-15-00011).

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБРАТНЫХ ТРАНСКРИПТАЗ В ОТ-LAMP

И. П. Оскорбин<sup>1</sup>, Л. М. Новикова<sup>1</sup>, М. Л. Филипенко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ osc.igor@gmail.com

### Аннотация

Обратные транскриптазы (ОТ) — семейство ферментов, синтезирующих ДНК по матрице РНК и применяемых для изучения РНК и выявления РНК-вирусов. Наиболее популярная ОТ — ОТ вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV ОТ) и её мутантные аналоги. Эффективность разных вариантов M-MuLV ОТ в петлевой изотермической амплификации (LAMP), применяемой для диагностики патогенов, остаётся неизвестной.

Обратные транскриптазы (ОТ) — семейство ДНК-полимераз, синтезирующих ДНК по матрице РНК. ОТ активно используются в фундаментальной науке и медицинской диагностике в исследованиях, связанных с РНК, и для выявления разнообразных патогенов человека, животных и растений. Наиболее часто используемой ОТ является ОТ вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV ОТ) и её мутантные аналоги. M-MuLV ОТ хорошо изучена, и её эффективность в практических приложениях описана во многих исследованиях [1–7]. Однако сравнение работы разных вариантов M-MuLV ОТ не проводилось. В частности, неизвестна эффективность мутантных вариантов M-MuLV ОТ в петлевой изотермической амплификации (LAMP). LAMP проводится при постоянной температуре, обладает сравнимой с ПЦР чувствительностью и специфичностью и более устойчива к действию ингибиторов. На основе LAMP создаются диагностические тесты, пригодные для использования в полевых условиях вне диагностических лабораторий [8–11]. Выбор наиболее быстрых и устойчивых к ингибиторам ферментов, в том числе ОТ, позволит повысить эффективность LAMP.

В настоящей работе мы провели прямое сравнение нескольких обратных транскриптаз в LAMP с обратной транскрипцией (ОТ-LAMP). Для сравнения выбрали две ОТ с большим количеством мутаций, Superscript III и Superscript IV, M-MuLV ОТ без домена РНКазы Н (M-MuLV ОТ Н<sup>-</sup>), M-MuLV ОТ с мутациями L139P, D200N, T330P (RT mut), а также M-MuLV ОТ Н<sup>-</sup> и RT mut с присоединённым ДНК-связывающим белком Sto7d. Выбранные ОТ сравнивали на моделях ОТ-LAMP для выявления фага MS2 и вируса SARS-CoV-2. Все ферменты были способны проводить ОТ-LAMP при концентрации от 0,8 до 10 е.а. на реакцию. Оптимальная температура обратной транскрипции с помощью Superscript III и Superscript IV находилась в диапазоне 60–65°C, RT mut –60°C, M-MuLV ОТ Н<sup>-</sup> –55°C. Химерные ОТ не отличались по оптимальной температуре от исходных ферментов. Увеличение времени обратной транскрипции приводило к ускорению ОТ-LAMP на 5–10 минут в зависимости от фермента. Химерные ферменты быстрее проводили ОТ-LAMP для выявления фага MS2, однако не отличались от остальных ферментов в ОТ-LAMP для выявления SARS-CoV-2. Все исследованные ферменты были способны генерировать позитивный сигнал в ОТ-LAMP при добавлении матрицы РНК в диапазоне 10<sup>1</sup>–10<sup>6</sup> копий на реакцию. Мутантные ОТ и химерные ОТ превосходили M-MuLV ОТ Н<sup>-</sup> по устойчивости к ингибиторам: цельной крови человека, плазме крови, солям гуанидина, NaCl. Диапазон концентраций ингибиторов, при которых эти ферменты сохраняли активность, увеличился в 1,5–6 раз в зависимости от ингибитора. Коммерческие ОТ Superscript III и Superscript IV были более устойчивы к ингибиторам, чем ОТ с тремя мутациями или с Sto7d. Ингибирующий эффект изотиоцианата гуанидина был выше, чем у хлорида гуанидина.

Подводя итоги, мы провели первое сравнение нескольких вариантов популярной обратной транскриптазы M-MuLV ОТ в LAMP с обратной транскрипцией. Показано, что все ферменты способны катализировать ОТ-LAMP в одинаковом диапазоне концентраций ферментов и РНК-матрицы. Установлено, что наличие мутаций в ОТ повышало оптимальную температуру шага обратной транскрипции в ОТ-LAMP. Увеличение времени обратной транскрипции приводило к ускорению ОТ-LAMP. Наличие мутаций или дополнительного ДНК-связывающего домена Sto7d увеличивало устойчивость ОТ к ингибиторам амплификации. Проведённое сравнение может быть полезно при выборе оптимальной обратной транскриптазы для ОТ-LAMP при создании диагностических тестов.

### Литература

1. Roth M.J., Tanese N., Goff S.P. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260, № 16. P. 9326–9335.
2. Kaushik N. et al. Tyrosine 222, a Member of the YXDD Motif of MuLV RT, Is Catalytically Essential and Is a Major Component of the Fidelity Center // Biochemistry. 1999. Vol. 38, № 9. P. 2617–2627.

3. Gerard G.F. et al. The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2002. Vol. 30, № 14. P. 3118–3129.
4. Skasko M. et al. Mechanistic Differences in RNA-dependent DNA Polymerization and Fidelity between Murine Leukemia Virus and HIV-1 Reverse Transcriptases // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 13. P. 12190–12200.
5. Oz-Gleenberg I. et al. Substrate variations that affect the nucleic acid clamp activity of reverse transcriptases. // *FEBS J.* 2012. Vol. 279, № 10. P. 1894–1903.
6. Whiting S.H., Champoux J.J. Strand displacement synthesis capability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. // *J. Virol.* 1994. Vol. 68, № 8. P. 4747–4758.
7. Chen D., Patton J.T. Reverse transcriptase adds nontemplated nucleotides to cDNAs during 5'-RACE and primer extension. // *Biotechniques.* 2001. Vol. 30, № 3. P. 574–580, 582.
8. Poon L.L.M. et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification // *J. Clin. Microbiol.* 2005. Vol. 43, № 1. P. 427–430.
9. Modak S.S. et al. Rapid point-of-care isothermal amplification assay for the detection of malaria without nucleic acid purification. // *Infect. Dis. (Auckl).* 2016. Vol. 9. P. 1–9.
10. The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance // *The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance.* World Health Organization, 2016.
11. Guo X.G. et al. Rapid and reliable diagnostic method to detect Zika virus by real-time fluorescence reverse transcription loop-mediated isothermal amplification // *AMB Express.* 2018. Vol. 8, № 1.

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МИКРОГЛИИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А. Д. Охальников, М. С. Гавриш, А. А. Бабаев

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

✉ a11o20@mail.ru

### Аннотация

Болезнь Альцгеймера (БА) — нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей потерей памяти и снижением когнитивных способностей с последующей утратой основных функций организма. И хотя белковые агрегаты  $\beta$ -амилоида и гиперфосфорилированного тау-белка уже давно идентифицированы, как характерные нейропатологические признаки, терапия против этих мишеней не продемонстрировала ожидаемых результатов. На сегодняшний день одной из перспективных терапевтических мишеней рассматриваются резидентные иммунные клетки головного мозга — микроглия.

При БА микроглия играет двойственную роль. На ранней стадии болезни она выполняет защитные функции: олигомерный  $A\beta$  активирует микроглию по M1 пути, что ведёт к активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, ответственного за синтез провоспалительных цитокинов таких как IL-1b, TNF $\alpha$ , IL-6 и т.д. Наличие данных молекул способствует активной миграции микроглии в очаг воспаления и пролиферации клеток — тем самым она создаёт физический барьер вокруг  $A\beta$  бляшек, снижая их токсичность и рост. После начала активации микроглии по M1 пути, быстро начинается противовоспалительная и восстановительная фаза, микроглия переходит в M2 фенотип, что позволяет ей фагоцитировать  $\beta$ -амилоид, а также продуцировать противовоспалительные цитокины IL-13, IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  и различные факторы роста, тем самым снижая провоспалительные иммунные реакции. Однако со временем микроглия утрачивает способность поддерживать гомеостаз и переходит в состояние хронического воспаления, что ведёт к гибели нейронов, нарушению клиренса и высвобождению токсинов. Данная потеря функций, вероятно, связана с нарушением баланса микроглии между фенотипами M1 и M2.

Целью данной работы явилось охарактеризовать морфологическую гетерогенность амилоидассоциированной микроглии в мышинной модели 5xFAD.

Мыши линии 5xFAD экспрессируют человеческие трансгены APP и PSEN1 с пятью мутациями, связанными с БА. Неправильный процессинг белка предшественника амилоида ведёт к постепенному внутри- и внеклеточному накоплению  $\beta$ -амилоида. По литературным данным, первые  $A\beta$  бляшки появляются на второй месяц жизни, и их количество возрастает с возрастом. В данном исследовании анализировались сагиттальные срезы головного мозга мышей в возрасте 15-16 месяцев. Для визуализации результатов иммуноцитохимического окрашивания на  $\beta$ -амилоид и маркер микроглии Iba1 использовали микроскоп LSM 800 (Zeiss, Германия). Дальнейшую обработку изображений, с целью определения плотности и среднего ветвления микроглии в области  $A\beta$  бляшек, а также выделения микроглиальных подтипов по морфологическим признакам, производили в приложении Image J с дополнительными плагинами Skeletonize и Skeleton analysis.

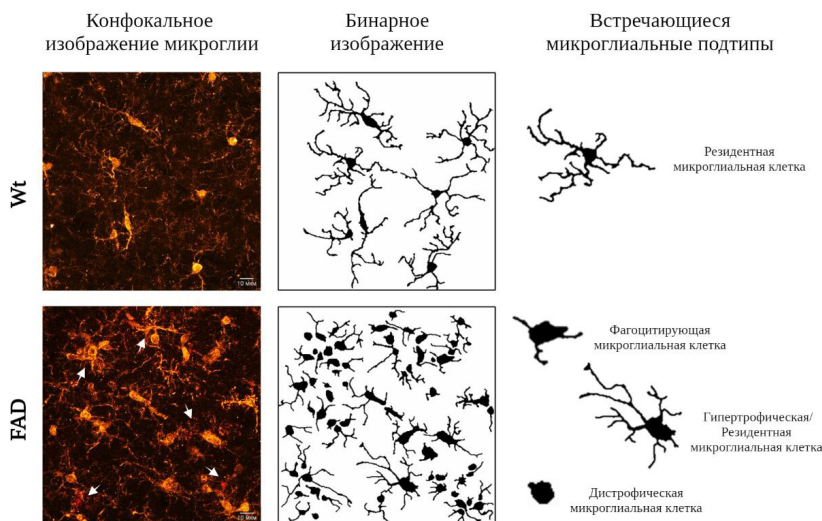


Рис. 1. Гетерогенность микроглии при болезни Альцгеймера. Красный канал — Alexa Fluor® 647 (Ex/Em 652/668), окраска  $\beta$ -амилоида; оранжевый канал — Alexa Fluor® 555 (Ex/Em 555/565), окраска микроглии (Iba1); ► —  $A\beta$  бляшки; scale bar — 10 мкм

показали, что в здоровом мозге микроглия представлена одним подтипом — резидентной микроглией. Данный подтип отвечает за поддержание гомеостаза центральной нервной системы, характеризуется длинными и ветвящимися отростками, которые патрулируют свое микроокружения. В отличие от дикого типа, микроглия мышей с признаками БА имеет три подтипа: гипертрофическая/резидентная, выполняющая сигнальные и защитные функции; фагоцитирующая микроглия, обладающая укороченными отростками и увеличенной сомой; дистрофическая микроглия, которая утратила свои защитные функции и характеризуется повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов, уменьшенной сомой и отсутствием отростков (рис. 1).

Результаты анализа плотности и среднего ветвления микроглиальной клетки показали, что оба исследуемых параметра статистически значимо ( $p \leq 0,001$ , t-критерий Стьюдента) отличаются в исследуемых группах. Так среднее ветвление микроглии у мышей с признаками БА меньше на 66 %, однако, плотность клеток в очаге воспаления выше на 82 % по сравнению с диким типом (рис. 2).

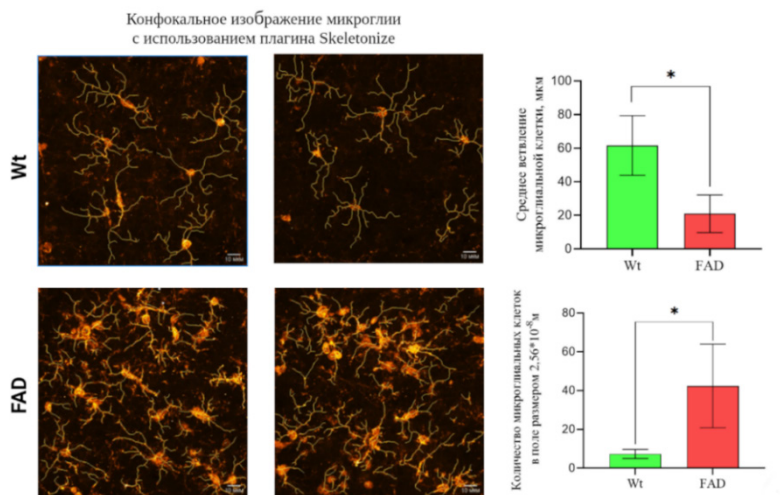


Рис. 2. Результаты оценки среднего ветвления и плотности микроглии

Таким образом, наличие амилоидных бляшек способствует миграции микроглии в очаг воспаления, переходу микроглии в фагоцитирующий и дистрофический подтип, что ведет к увеличению плотности микроглиальных клеток и уменьшению их среднего ветвления.

## ИНГИБИРОВАНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ПУТЕМ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ МИРНК В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РАНАХ \*

А. С. Панюта, А. А. Тюлин, Ю. М. Пилипенко, Е. Ф. Кривошапкина

Санкт-Петербургский университет информационных технологий, механики и оптики, SCAMT

✉ panyuta@scamt-itmo.ru

### Аннотация

В диабетических хронических ранах гиперэкспрессия матриксной металлопротеиназы-9 препятствует образованию грануляционной ткани, что повышает риск инфицирования. В данной работе была исследована композиция на основе полиэлектролитных комплексов малой интерферирующей РНК (миРНК) и RGD-содержащих пептидов и определено оптимальное соотношение комплекса миРНК/пептид для достижения наилучшего терапевтического эффекта.

Одной из основных причин нарушения ремоделирования ткани в процессе заживления диабетических хронических ран является гиперэкспрессия матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) в период стадии воспаления [1, 2]. Это приводит к деградации «нецелевых» белков внеклеточного матрикса, а также инактивации важных факторов роста, таких как тромбоцитарный и эпидермальный [1]. Использование технологии миРНК для ингибирования гена, экспрессирующего ММП-9, позволит обеспечить переход от воспалительной фазы в ране к стадии пролиферации. Известно, что миРНК подвержена быстрой нуклеазной деградации, поэтому применение RGD-содержащих пептидов как платформы для доставки лекарства сможет повысить эффективность клеточного проникновения миРНК, а также обеспечит ее защиту от разрушения.

**Целью** исследования была разработка способа формирования гибридных трехмерных материалов, способных к ингибированию гиперэкспрессии ММП-9 в раневом ложе через таргетную доставку пептидных наночастиц с миРНК.

В данной работе в качестве платформы для целевой доставки миРНК был использован RGD-содержащий пептид (в его структуру включены три значимые аминокислоты — аргинин, глицин и аспарагиновая кислота). Преимуществом использования RGD-последовательности в пептиде является ее специфическое связывание с белком интигрином на поверхности клеточной мембраны, что обеспечивает высокоэффективное проникновение комплекса с миРНК в клетку [3]. Для формирования миРНК/пептид частиц было использовано различное N/P (азот/фосфор) соотношение пептида к миРНК, равное 8/1, 16/1 и 24/1, соответственно. С помощью метода динамического светорассеяния был установлен размер комплексов, который не превышал 100 нм. Измерение дзета-потенциала показало, что поверхностный заряд наночастиц — положительный. С помощью электрофореза в агарозном геле было обнаружено, что для N/P-соотношения, равного 8/1, характерно неполное связывание миРНК с пептидом, в то время как для остальных соотношений не было зафиксировано выхода миРНК из частиц.

Цитотоксичность миРНК/пептид комплексов была определена с помощью МТТ-теста на клеточной модели аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, экспрессирующей большое количество ММП-9 после обработки форбол 12-миристинатом 13-ацетатом [4]. Установлено, что клеточная выживаемость составляла более 85 % в течение 72 ч, что свидетельствует об отсутствии токсичности исследуемых комплексов. С помощью проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии было показано, что миРНК успешно доставляется во внутриклеточное пространство, при этом наиболее эффективная доставка осуществляется в случае соотношения 16/1.

Таким образом, в результате оптимизации композиции комплексов миРНК / RGD-содержащий пептид было установлено, что наиболее оптимальным N/P-соотношением является соотношение 16/1. Результаты исследования могут быть применены для создания «умной» ранозаживляющей повязки на основе биodeградируемого гидрогеля, которая в ответ на внешние факторы — повышенную концентрацию ММП-9 в раневом ложе — сможет обеспечить высвобождение полученных частиц и последующее ингибирование синтеза фермента.

### Литература

1. Castleberry S. A. et al. Self-assembled wound dressings silence MMP-9 and improve diabetic wound healing *in vivo* // *Advanced Materials*. 2016. V. 28(9). P. 1809–1817.
2. Lan B. et al. Sustained delivery of MMP-9 siRNA via thermosensitive hydrogel accelerates diabetic wound healing // *Journal of nanobiotechnology*. 2021. V. 19(1). P. 1–17.
3. Lindemann W. R. et al. Conformational dynamics in extended RGD-containing peptides // *Biomacromolecules*. 2020. V. 21(7). P. 2786–2794.
4. Roomi M. W. et al. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines // *Oncology reports*. 2009. V. 21(5). P. 1323–1333.



## АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОРНК НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ МОЛОКА КОРОВЫ\*

А. П. Парамоник<sup>1,2</sup>, С. Е. Седых<sup>1,2</sup>, Г. А. Невинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ paramonik.ap@gmail.com

### Аннотация

Экзосомы — природные везикулы, которые имеют потенциал применения в качестве средств адресной доставки. Препараты экзосом молока могут содержать примеси белков и нуклеиновых кислот, совыделяющихся на разных этапах выделения. Дополнительная очистка препаратов экзосом гель-фильтрацией приводит к уменьшению содержания микроРНК в 4–17 раз.

Экзосомы — мембранные нановезикулы эндосомального происхождения. Экзосомы имеют диаметр 40–100 нм, способны переносить биологически активные вещества и сигнальные молекулы как внутри себя, так и на поверхности мембраны. Экзосомы имеют высокую биологическую совместимость и способны преодолевать различные биологические барьеры. Перечисленные выше особенности делают экзосомы перспективным средством доставки терапевтических молекул.

Для потенциального использования в медицине экзосомы изучены недостаточно, не решена проблема получения экзосом в достаточном для терапии количестве и нужной степени очистки. Единственным биологическим источником, содержащим экзосомы, доступным в промышленных масштабах, является молоко. Экзосомы, выделенные из коровьего молока, могут содержать примеси белков и нуклеиновых кислот, совыделяющихся на разных этапах выделения экзосом.

Ранее в лаборатории ферментов репарации ИХБФМ СО РАН был разработан протокол дополнительной очистки экзосом методом гель-фильтрации. Данная работа посвящена оценке содержания микроРНК на разных этапах выделения экзосом из молока коровы. Проведен анализ четырех фракций: липидная фракция, фракция клеточного осадка, фракция, содержащая экзосомы, полученная ультрацентрифугированием и фракция экзосом после дополнительной очистки методом гель-фильтрации.

Для выделения микроРНК из образцов использовали реагент ЛиРа (Биолабмикс, Новосибирск) и спин-колонки с кремниевой мембраной. Анализ микроРНК проводили методом обратной транскрипции с использованием stem-loop (SL) праймеров и последующим ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

Показано, что микроРНК 148a-3p, 146b-5p, 200c-3p и 378a-3p содержатся во всех фракциях, отобранных на разных стадиях выделения экзосом из молока коровы. Концентрация данных микроРНК увеличивается в ряду: экзосомы после гель-фильтрации, экзосомы до гель-фильтрации, клеточный осадок, жировая фракция. Дополнительная очистка методом гель-фильтрации приводит к уменьшению содержания микроРНК в препаратах экзосом в 4–17 раз.

Полученные результаты могут быть важны для использования экзосом молока коровы в качестве средств доставки терапевтических нуклеиновых кислот.

\* Исследование поддержано проектом РНФ № 18-74-10055 (рук. С. Е. Седых).

© А. П. Парамоник, С. Е. Седых, Г. А. Невинский, 2022

## AN SHRNA RELEASING DNA NANOSTRUCTURE WITH ONCOMARKER-DEPENDENT ACTIVATION\*

C. Patra<sup>1</sup>, V. Smirnov<sup>1</sup>, A.A. Eldeeb<sup>1</sup>, D.M. Kolpashchikov<sup>2-4</sup><sup>1</sup>Laboratory of Molecular Robotics and Biosensor Materials, SCAMT Institute, ITMO University, Saint-Petersburg, Russia<sup>2</sup>Chemistry Department, University of Central Florida, Florida, USA<sup>3</sup>Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Florida, USA<sup>4</sup>National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Florida, USA

✉ christina@scamt-itmo.ru

**Abstract**

This paper presents the combination of DNA nanotechnology with RNA interference to develop a DNA nanomachine capable of releasing shRNA only in the presence of a marker sequence to target housekeeping genes. This system can lay the foundation for new highly selective RNAi agents with high efficiency towards cancer cell death.

RNA interference has become a simple but advantageous tool for studying gene functions and gene therapy. Especially in gene therapy, RNAi has shown great potential, with some RNAi-based drugs being approved by the FDA. However, this technology has some limitations — mainly the not tightly-controlled silencing of target genes. To address this problem which delimits the clinical use of such progressive therapeutic agents, we suggest combining the technologies of DNA nanostructure with RNAi to equip the agents with a new property; marker-dependent activation.

In 2006 the Nobel Prize in Physiology or Medicine was won for the discovery of RNA interference by dsRNA. Since then, dsRNA has been broadly studied and used as an RNAi-based gene therapy agent for down-regulating genes associated with disease. Based on this, we selected as our interfering agent an Ago-mediated shRNA (agoshRNA). According to our previous experience with the K562 cell line, agoshRNA has higher interference potency than the Dicer-mediated shRNA and siRNA.

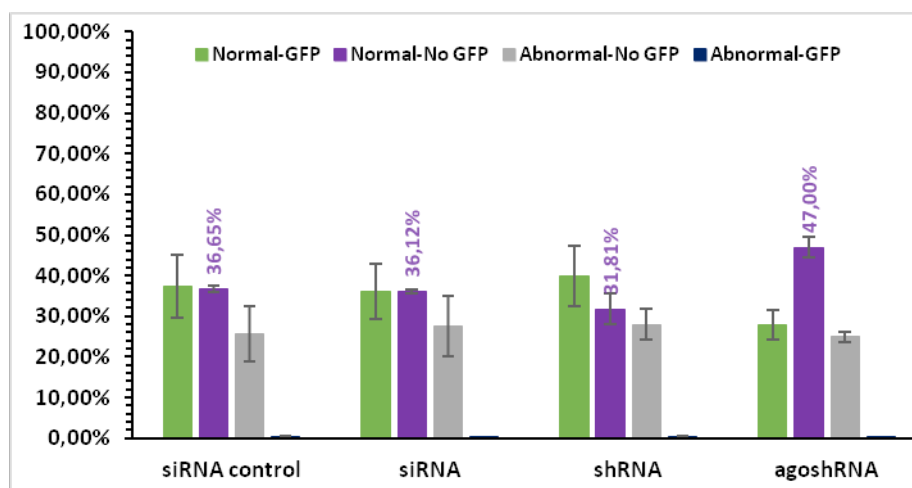


Fig. 1. Effect of different RNA agents on K562 cell line morphology and green fluorescence. Among traditional siRNA and shRNA, the Ago-mediated shRNA shows highest suppression of GFP fluorescent while maintaining the same level of effect on the morphology of the cells

Several DNA nanostructures were designed to release agoshRNA in a marker-dependent manner. The general concept is the addition of a nucleotide tail to the agoshRNA which is expected to reduce its potency.<sup>[2]</sup> However, it will act as an anchoring tail to the DNA nanostructure. Using our marker-dependent DNAzyme, we will cleave the excess tail only in the presence of marker sequence, releasing in this way the fully active form of agoshRNA. By using oncomarkers as facilitators of the release, we can achieve activation of their therapeutic function only in cancer cells.

\* The research was supported by the Priority 2030 Federal Academic Leadership Program.  
© C. Patra, V. Smirnov, A. A. ElDeeb, D. M. Kolpashchikov, 2022

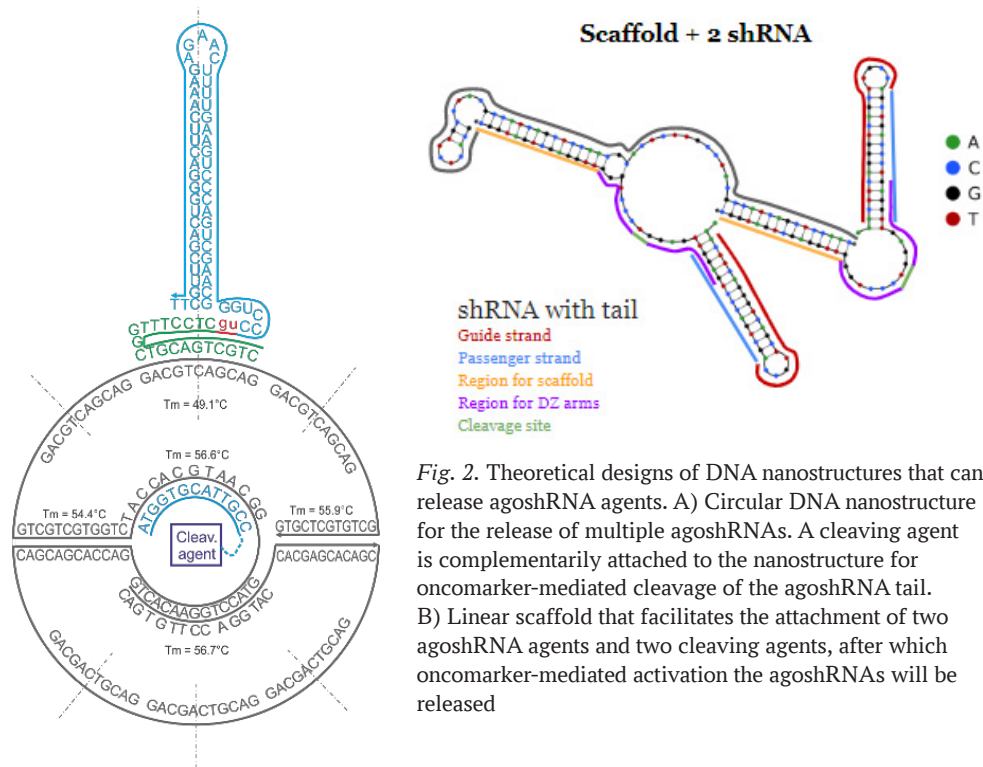


Fig. 2. Theoretical designs of DNA nanostructures that can release agoshRNA agents. A) Circular DNA nanostructure for the release of multiple agoshRNAs. A cleaving agent is complementarily attached to the nanostructure for oncomarker-mediated cleavage of the agoshRNA tail. B) Linear scaffold that facilitates the attachment of two agoshRNA agents and two cleaving agents, after which oncomarker-mediated activation the agoshRNAs will be released

Consequently, the gene downregulation will be controlled by oncomarker-dependent processing, which will initiate cleavage by a selective DNase and subsequent release of the agoshRNA. The oncomarker-dependent activation property will make our therapeutic agent valuable for therapeutic use. After cell culture experiments, we will select the optimal DNA nanomachine for the release of several agoshRNA by a single oncomarker sequence and implement this oncomarker dependent system to suppress housekeeping genes exclusively in cancer cells.<sup>[1]</sup>

### References

1. Nedorezova D.D., Fakhardo A.F., Nemirich D.V., Bryushkova E.A., Kolpashchikov D.M. Towards DNA Nanomachines for Cancer Treatment: Achieving Selective and Efficient Cleavage of Folded RNA // *Angewandte Chemie — International Edition*, 2019, 4654-4658
2. Sun G., Yeh S.Y., Wan-Yin Yuan C., Jean-Yih Chiu M., Shing Hei Yung B., Yen Y. Molecular properties, functional mechanisms, and applications of sliced siRNA // *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 4, 2015, e221

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЦНС\*

А. О. Пенькова, А. П. Шуляк, Д. В. Ланских, В. М. Жменя, В. В. Кумейко

*Лаборатория биомедицинских клеточных технологий,  
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*

✉ penkova-ao@dvvfu.ru

### Аннотация

Наиболее распространенным злокачественным новообразованием в ЦНС является глиома. Согласно последней классификации ВОЗ, для установления типа глиомы необходимо определение мутаций в ряде генов, однако отсутствуют системы для проведения доступной лабораторной диагностики. В данной работе представлен прототип такой системы для определения мутаций в ключевых генах на основе ПЦР в реальном времени.

Глиома — нейроэпителиальная опухоль, гистологически сходная с нормальными глиальными клетками. Среди всех типов глиом чаще всего встречаются глиобластомы (54,4 %) и астроцитомы (13,4 %) [1]. Согласно классификации ВОЗ 2021 г., для постановки точного диагноза необходимо определение мутаций в генах IDH1/2, TP53, ATRX, BRAF, CDKN2A/B, EGFR, MGMT, TERT, делеции 1p/19q и других молекулярных маркеров [2]. Тем не менее, в России не зарегистрированы системы для диагностики этих мутаций, доступные для использования в большинстве клинико-диагностических лабораторий, в результате чего отсутствует возможность для персонализированного лечения и статистический учет таких онкологических больных.

IDH1 — ген, кодирующий фермент изоцитратдегидрогеназу 1. Согласно [3], его мутантный вариант встречается в 24,88 % глиом. Наличие мутации R132H может служить основанием для постановки диагноза «астроцитомы» или «олигодендроглиома», свидетельствует о более благоприятном прогнозе [2]. Белок p53 является транскрипционным фактором для генов, участвующих в остановке клеточного цикла, прохождении апоптоза, предотвращая опухолевую трансформацию клетки [4]. Мутации в TP53 характерны для IDH1-мутантных астроцитом высокой степени злокачественности [2].

Целью данной работы является разработка системы для диагностики миссенс-мутаций IDH1 R132H и TP53 R175H, R248W, R273H с помощью ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green.

Материалом послужили плазмиды, содержащие соответствующие мутации. Диагностика осуществляется на основании различий в температурах плавления ампликонов мутантного и дикого типов, детектируемых при анализе кривой плавления после количественной ПЦР. Различие температур объясняется строением праймеров: те, которые отжигаются на мутантный аллель, имеют больший GC-состав по сравнению с отжигающимися на дикий тип.

Результаты исследования представлены на рисунке и в таблице ниже.

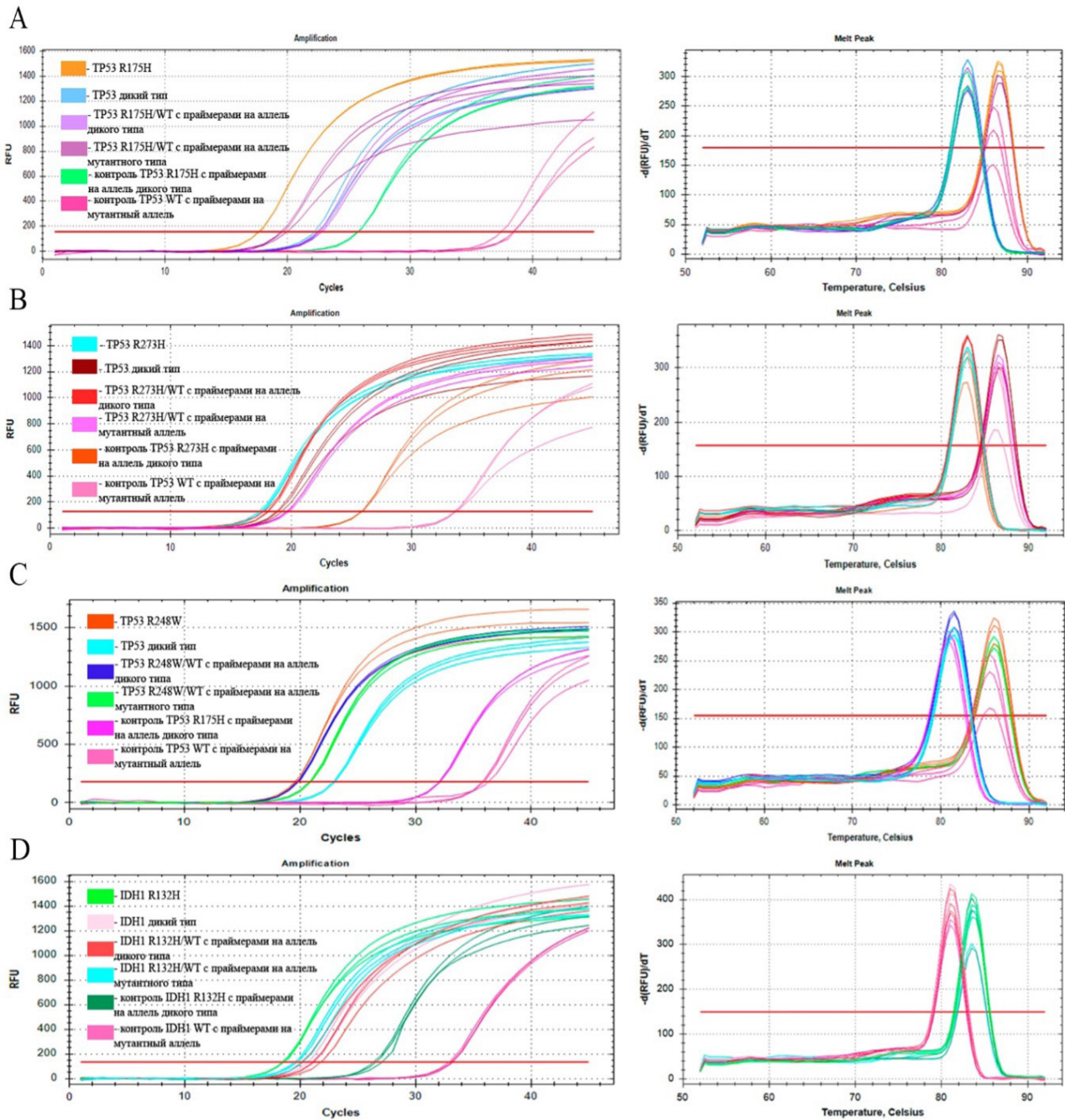
### Характеристика гомо- и гетерозиготных вариантов мутаций в генах IDH1 и TP53

Мутация	Диагностические отличия				
	Плаزمида	Праймер			
		WT		MUT	
		Ct	Tm	Ct	Tm
TP53 R175H	WT	21,2	83	36,9	87
	TP53 R175H	26,1	83	18,0	87
	R175H/WT	19,6	83	22,9	87
TP53 R273H	WT	17,9	83	25,9	83
	TP53 R273H	32,8	87	18,6	87
	R273H/WT	18,7	83	20,6	87
TP53 R248W	WT	22,5	82	34,4	86
	TP53 R248W	32,1	81	20,2	86
	R248W/WT	19,6	82	21,3	86

\* Исследование финансировалось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0657-2020-0004.

Мутация	Диагностические отличия				
	Плаزمида	Праймер			
		WT		MUT	
		Ct	Tm	Ct	Tm
IDH1 R132H	WT	20,8	81	26,3	83
	IDH1 R132H	33,2	81	18,9	84
	R132H/WT	20,9	81	19,6	84

Примечание. \*WT — дикий тип, MUT — содержащий мутацию, Ct — пороговый цикл, Tm — температура плавления.



Кривые накопления WT и пики температур плавления ампликонов дикого типа и содержащих мутации: *A* — выявление мутации R175H в гене TP53; *B* — выявление мутации R273H в TP53; *C* — выявление мутации R248W в TP53; *D* — выявление мутации R132H в гене IDH1

В результате работы была получена диагностическая система для определения гомо- и гетерозиготных вариантов мутаций IDH1 R132H и TP53 R175H, R248W, R273H. Ее преимущество в низкой стоимости за счет использования интеркалирующего красителя, а не флюоресцентного зонда, а также в способности определения гетеро- и гомозиготных вариантов. Недостатком является возможность использования только для однонуклеотидных мутаций.

#### **Литература**

1. Miller K. D. et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021 // CA: a cancer journal for clinicians. 2021. Т. 71. № 5. С. 381–406.
2. Torp S. H., Solheim O., Skjulsvik A. J. The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know — a minireview // Acta Neurochirurgica. 2022. С. 1–12.
3. My cancer genome. URL: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/glioma/>.
4. Lane D. P. p53, guardian of the genome // Nature. 1992. Т. 358. № 6381. С. 15–16.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К РАДИАЦИОННОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ\*

Е. С. Погодина, Е. В. Расторгуева, Е. В. Юрова, Е. А. Белобородов, Д. Е. Сугак

Ульяновский государственный университет

✉ JaneG1411@yandex.ru

### Аннотация

Нерешенной проблемой радиационной терапии остается устойчивость некоторых опухолей к воздействию облучения. В работе изучено влияние динамики экспрессии генов и межмолекулярных взаимодействий белков на становление радиорезистентности клеток опухолей. Выявлены гены-мишени и белковые каскады, которые являются важным звеном в процессе приобретения опухолевыми клетками устойчивости к облучению.

Задача радиотерапии заключается в эффективном и безопасном лечении злокачественных новообразований. Данный вид лечения не оказывает негативного влияния на здоровые ткани и органы. Однако несмотря на свои достижения радиационная терапия сталкивается с проблемой приобретения некоторыми опухолями резистентности к воздействию облучения [1]. В связи с этим изучено влияние уровня экспрессии генов и белок-белковых взаимодействий на развитие радиорезистентности опухолевых клеток.

Исследование проводилось на клеточных линиях K562, HCT-116 (с мутантным и нормальным геном *TP53*) и Me45. Транскриптом анализировался с помощью ДНК-чипов (Affymetrix, HGU133A). Биоинформационный анализ динамики экспрессии генов выполнялся в программе Gene Selector. В онлайн-программе STRING проводилось исследование белок-белковых взаимодействий.

На основе биоинформационного анализа установлено, что динамика экспрессии генов *DAAM1*, *IFNAR2*, *PALLD* и *STK17A* [2], после облучения в дозе 4 Гр, увеличивалась в радиорезистентной клеточной линии K562, а в радиочувствительных клеточных линиях HCT-116 (с мутантным и нормальным геном *TP53*) и Me45 их уровень экспрессии снижался. Такая интенсивность экспрессии в исследуемых опухолевых клеточных линиях вызвана воздействием ионизирующего излучения и, очевидно, связана с процессом становления устойчивости опухолевых клеток к облучению [3]. С помощью интернет-системы STRING проанализированы сети молекулярных взаимодействий генов *DAAM1*, *IFNAR2*, *PALLD* и *STK17A*, поскольку они являются основой многих внутриклеточных процессов. Выявлено, что активность белков исследуемых генов, которые являются частью сигнальных каскадов (*DAAM1*, *DVL2*, *PTBP2* и *TNK2*; *IFNAR2*, *GNB2L1*, *IRF9*, *STAT2*, *JAK1* и *IFNAR1*; *PALLD*, *ACTN2* и *LPP*), отличаются в радиорезистентной и радиочувствительных клеточных линиях и оказывают влияние на других участников сети [4]. Ввиду того, что взаимосвязь между белковыми молекулами является ключевым звеном во внутриклеточных процессах, среди которых становление резистентности к лазерному облучению, то отобранные гены и кодируемые ими белковые каскады могут выступать в качестве потенциальных мишеней, модуляция которых позволит увеличить ответ клеток злокачественных опухолей на облучение ионизирующего излучения.

### Литература

1. Arnold C.R., Mangesius J., Skvortsova I.I., Ganswindt U. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance // Front. Oncol. 2020. № 10. P. 164.
2. Глушенко Е.С., Слесарев С.М., Московкин А.А. и др. Дифференциальная экспрессия генов и активация сигнальных путей в радиорезистентных и радиочувствительных раковых клеточных линиях // Совр. технологии в медицине. 2016. № 8(2). P. 14–21.
3. Zhang M.X., Wang L., Zeng L., Tu Z.W. LCN2 Is a Potential Biomarker for Radioresistance and Recurrence in Nasopharyngeal Carcinoma // Front. Oncol. 2021. № 2. P. 10.
4. Foy J.P., Bazire L., Ortiz-Cuaran S. A 13-gene expression-based radioresistance score highlights the heterogeneity in the response to radiation therapy across HPV-negative HNSCC molecular subtypes // BMC Med. 2017. № 15(1). P. 165.

\* Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания № 0830-2020-0008.

## ИММУНОСИГНАТУРЫ РЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСА И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\*

С. В. Подлесных<sup>1</sup>, П. И. Колтышева<sup>1</sup>, Е. Д. Тищенко<sup>1</sup>, Я. Н. Шойхет<sup>2</sup>, А. Ф. Лазарев<sup>2</sup>, А. М. Авдалян<sup>3</sup>,  
И. В. Вихлянов<sup>3</sup>, И. А. Беленинова<sup>3</sup>, Т. В. Синкина<sup>3</sup>, С. А. Джонстон<sup>4</sup>, А. И. Шаповал<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул

<sup>2</sup>Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

<sup>3</sup>Алтайский краевой онкологический диспансер, Барнаул

<sup>4</sup>Университет штата Аризона, Темпе, США

✉ step-uch@mail.ru

### Аннотация

Представлен анализ разнообразия репертуара антител при раке молочной железы. Показано, что анализ циркулирующих антител (иммуносигнатуры) позволяет на ранних стадиях отличать молекулярные подтипы этого заболевания.

Выявление особенностей изменения рака молочной железы на молекулярном уровне становится важным фактором развития ранней диагностики и выбора эффективного лечения [1, 2]. Ранняя продукция антител, сопровождающая молекулярные трансформации, может быть маркером онкогенеза.

### Цель

Разработать методы оценки иммуносигнатуры гормонально-рецепторного статуса и молекулярных подтипов рака молочной железы (РМЖ).

### Материалы и методы

Исследуемая группа — 81 женщина 40–60 лет. В первой группе 40 пациентов с диагнозом РМЖ (С 50, Т1-И), во второй — контроль — 41 здоровый донор. Определяли экспрессию рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), HER2, Ki67. По клиническим рекомендациям выявляли соответствие подтипам. Использовали пептидные микрочипы (330 тыс.). Каждый пептид имеет случайную последовательность аминокислот [3]. Образец — плазма крови (1 мкл.).

### Результаты

В начале исследования, используя пептидные микрочипы (330 тыс.), выявлено, что антитела (или иммуносигнатуры) в плазме крови пациентов с диагнозом РМЖ обнаруживаются и специфично взаимодействуют со 119 пептидами. Определена структура этих пептидов и общие мотивы аминокислот. Далее был проведен анализ иммуносигнатуры в зависимости от рецепторного статуса, так были выявлены 322 пептида, с которыми взаимодействуют антитела плазмы крови «ER+» и «ER-», 61 пептид для «PR+» и «PR-» РМЖ-пациентов, и 379 пептидов при экспрессии Ki67. После этого проведен анализ циркулирующих антител у пациентов, при разных молекулярных подтипах РМЖ. Было выявлено взаимодействие с разными пептидами, а также смешанными группами. В результате выявлены 634 пептида, специфически взаимодействующие с антителами этих пациентов. Используя кластерный анализ, были выявлены и смешанные подтипы РМЖ. Обнаружены мотивы и в этих пептидах. Для всех выявленных пептидов в исследовании проведена физико-химическая характеристика. В Protein Data Bank, выявлены частичные гомологии пептидов с опухолеассоциированными белками.

### Выводы

Выявленные пептиды можно использовать в разработке тест-систем малоинвазивной ранней диагностики, уточнения диагноза и назначения персонализированной терапии.

### Литература

1. Шаповал А.И., Подлесных С.В., Курчанова Е.А. Молекулярный подход к диагностике и лечению злокачественных новообразований до их визуализации // Проблемы клин. медицины. 2014. № 3. С. 14–20.
2. Французова И.С. Анализ факторов риска развития рака молочной железы // Междунар. науч.-исслед. журн. 2019. Т. 81. № 3. С. 68–74.
3. Анисимов Д.С., Подлесных С.В., Колосова Е.А. и др. Анализ многомерных данных пептидных микрочипов с использованием метода проекции на латентные структуры // Мат. биология и биоинформатика. 2017. Т. 12. № 2. С. 435–445.

\* Работа выполнена при поддержке государственного задания № FZMW-2020-0007.



**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МАТРИКСЕ И ТРАНСМЕМБРАННОМ ПРОСТРАНСТВЕ МИТОХОНДРИЙ\***

Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров

*Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники  
Орловского государственного университета им. И. С. Тургенева*

✉ rennda@yandex.ru

**Аннотация**

При исследовании цитоплазматических гидридов получены данные о роли природы, сочетания и степени выраженности мутаций митохондриального генома на продукцию активных форм кислорода (АФК). Выявлено ингибирование образования супероксиданиона в трансмембранном пространстве комплексом III и увеличение продукции в матриксе митохондрий за счет мутаций генов комплекса I электронтранспортной цепи (ЭТЦ), а также 12S рРНК и тРНК<sup>Leu</sup>.

Общая численность ассоциированных с мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК) заболеваний приближается к 400 [1]. С учетом того, что пул мтДНК может содержать одновременно несколько мутаций с различным уровнем гетероплазии, возможность проявления мутаций в фенотипе определяется их сочетанием, локализацией в мтДНК и степенью гетероплазии. Поскольку из 37 содержащихся в мтДНК генов около трети кодирует белки ЭТЦ, нарушения митохондриального генома должны повлечь за собой изменения в уровне продукции АФК [2]. Хотя в норме АФК обеспечивают протекание ряда физиологических процессов, в случае преобладания над антиоксидантной системой они приводят к развитию повреждений клеток [3]. Поэтому являющееся целью настоящей работы выявление влияния природы мутаций мтДНК, их комбинаций и степени гетероплазии на скорость и локализацию продукции АФК является весьма актуальным.

Объектами исследования выступали цибридные линии на основе клеток ТНР-1, каждая из которых имеет от 7 до 10 мутаций мтДНК, затрагивающих гены первой (t3336c), второй (c5178a), пятой (g12315a и g13513a) и шестой (g14459a) субъединиц I комплекса, третьей субъединицы (g15059a и g14846a) III комплекса ЭТЦ, а также 12S рРНК (del652g и a1555g) и тРНК<sup>Leu</sup> (c3256t).

Оценку продукции АФК в матриксе митохондрий проводили с использованием зонда MitoTracker Red CM-H2Xros (500 нМ) и конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 при длине волны возбуждения 561 нм, уровня цитозольных АФК — зонда дигидроэтидий (HEt) при концентрации 5 мкМ на флуоресцентном микроскопе с детекцией интенсивности флуоресценции окисленной (длина волны возбуждения — 530 нм) и восстановленной форм (360 нм) зонда.

Исследованные цибриды характеризуются пониженной относительно ТНР-1 скоростью окисления HEt. В наибольшей степени это ассоциировано с мутацией g14846a, уровни гетероплазии которой 24, 26 и 28 % вызывают снижение продукции цитозольных АФК на 20, 26 и 34 % соответственно. Более низкие уровни гетероплазии по данной мутации значительного эффекта не оказывают, что говорит о существовании порогового значения проявления в фенотипе нарушений мтДНК. Также 39- и 33-процентное снижение окисления HEt связано с мутацией t3336c с уровнем гетероплазии соответственно 37 и 14 %. В остальных линиях снижение продукции цитозольных АФК не превышает 24 % и определяется целой совокупностью мутаций субъединиц комплекса I ЭТЦ. В этом случае, видимо, речь идет о дисфункции НАДН-дегидрогеназы, приводящей к уменьшению потока электронов через ЭТЦ. Все рассмотренные мутации являются причиной снижения уровня утечки электронов с комплекса III с образованием в трансмембранном пространстве АФК, которые можно зарегистрировать с помощью HEt.

Практически все цибриды характеризуются повышенной (от 25 до 600 %) относительно ТНР-1 продукцией АФК в матриксе митохондрий, что в наибольшей степени коррелирует с мутациями g12315a и g13513a при высоком уровне гетероплазии мутаций в генах элементов системы синтеза белков (прежде всего мутаций c3256t в гене тРНК<sup>Leu</sup> и del652g с уровнем гетероплазии выше 10 и 19 % соответственно). В целом увеличение скорости образования АФК в матриксе митохондрий можно рассматривать как следствие дисфункции НАДН-дегидрогеназы и утечки электронов с образованием супероксиданиона.

**Литература**

1. Naviaux R.K. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease // *Mitochondrion*. — 2004. — Т. 4. — №. 5-6. — С. 351-361.
2. Zorov D. B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release // *Physiological reviews*. — 2014. — Т. 94. — №. 3. — С. 909-950.
3. Mittler R. ROS are good // *Trends in plant science*. — 2017. — Т. 22. — №. 1. — С. 11-19.

\* Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00317.

© Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров, 2022

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БЕЛКА DDAH1 В ПРОЦЕССАХ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ НА МОДЕЛИ КУЛЬТУР КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ \*

Е. А. Просекина<sup>1</sup>, А. Е. Карпов<sup>2</sup>, Е. Ю. Федоруцева<sup>3</sup>, А. С. Артемьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>АО «БИОКАД», Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Томский государственный университет

✉ elizaveta.prosekina@gmail.com

### Аннотация

В данном исследовании изучена роль белка DDAH1 на способность клеток меланомы кожи образовывать псевдососудистые структуры в двухмерных модельных системах. Показано, что ингибирование DDAH1 препятствует активной миграции и инвазии клеток меланомы кожи, что в конечном итоге ведет к нарушению образования псевдососудов.

Васкулогенная мимикрия представляет собой новый малоизученный паттерн неоваскуляризации опухоли. Она встречается во многих злокачественных опухолях человека и способствует быстрой прогрессии заболевания, являясь неблагоприятным прогностическим показателем. Васкулогенная мимикрия представляет собой альтернативный механизм микроциркуляции опухоли: формирование сосудистоподобных сетей, высланных опухолевыми клетками, эффективно имитирующих настоящий сосудистый эндотелий. Этот процесс происходит *de novo*, без участия эндотелиальных клеток и не зависит от традиционного ангиогенеза [1]. Кроме того, высланные опухолью сосуды способны сливаться с обычной сосудистой сетью, обеспечивая адекватное кровоснабжение опухоли.

Активная продукция окиси азота (NO) злокачественными клетками играет патологическую роль в ангиогенезе и распространении опухоли. Синтез NO жестко регулируется семейством ферментов синтазы оксида азота (NOS) путем превращения аргинина в NO и L-цитруллин. В свою очередь, активность всех изоформ NOS снижается метилированными аргининами — асимметричным диметиларгинином (ADMA) и монометиларгинином (L-NMMA), которые действуют как конкурентные эндогенные ингибиторы. Диметиларгинин диметиламиногидролаза (DDAH), экспрессируемая в клетках млекопитающих в виде одной из двух изоформ, DDAH1 или DDAH2, обеспечивает > 80 % метаболизма ADMA и L-NMMA [2].

Диметиларгинин диметиламиногидролаза 1 (DDAH1) является ключевым ферментом, участвующим в метаболизме ингибиторов синтазы оксида азота (NOS), который способствует васкуляризации опухоли. Он может представлять из себя потенциальную мишень для ингибирования процессов васкулогенной мимикрии на ранних этапах васкуляризации опухоли.

Таким образом, целью данного исследования явилось изучение роли белка DDAH1 на способность образовывать псевдососудистые структуры клетками меланомы кожи человека.

В качестве модельных линий были использованы культуры клеток меланомы кожи человека, полученные из интраоперационного материала. С помощью динамической системы мониторинга в реальном времени xCELLigence (Agilent Technologies, Inc.) были изучены показатели пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток в нативном состоянии и с добавлением высокоспецифичного ингибитора DDAH1. С помощью теста образования трубок на матрикеле была изучена способность образовывать проводящие структуры опухолевыми клетками в отсутствие белка DDAH1.

В ходе исследования было установлено, что ингибирование белка DDAH1 не приводит к снижению пролиферации, однако снижает миграционные и инвазивные способности опухолевых клеток, препятствуя образованию трубчатых структур.

Таким образом, изучение роли DDAH1 в опухолях со сверхэкспрессией этого белка может представлять особый интерес, поскольку молекулярные механизмы, регулирующие васкулогенную мимикрию, до конца не изучены, но вполне вероятно, что они вовлечены и в классический ангиогенез. Ингибирование DDAH1 может быть значимо при лечении других видов онкологии, характеризующихся избыточной продукцией NO, и дальнейшие исследования в этой области являются оправданными.

### Литература

1. Chen L. et al. A Pilot Study of Vasculogenic Mimicry Immunohistochemical Expression in Intraocular Melanoma Model // *Oncology Reports*. 2009. V. 21(4) P. 989–994.
2. Hulin J. et al. Inhibition of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolyase (DDAH) Enzymes as an Emerging Therapeutic Strategy to Target Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Cancer // *Frontiers in Oncology*. 2020. V. 9. P. 1–16.

**ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ В СТРУКТУРЕ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК  
НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 *IN VITRO* \***

Д. В. Прохорова<sup>1,2</sup>, П. О. Толстова<sup>1,2</sup>, М. С. Купрюшкин<sup>1</sup>,  
И. С. Довыденко<sup>1</sup>, И. М. Переверзев<sup>1</sup>, Д. В. Пышный<sup>1</sup>, Г. А. Степанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ prohorova1994@gmail.com

**Аннотация**

Цель исследования — изучить влияние природных модифицированных мономеров и фосфорилгуанидиновых (ФГ) групп в структуре направляющих РНК на функционирование системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. В качестве модификаций выбраны N6-метиладенозин (m6A), 5-метилцитидин (m5C), псевдоуридин (Ψ) и ФГ-группы. Показано, что включение модификаций в направляющие РНК повышает специфичность работы системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

На сегодняшний день системы CRISPR/Cas применяются для разнообразных целей: регуляции транскрипции, изменения эпигенетического профиля, проведения полногеномного скрининга, визуализации хромосом и нокаута заданных генов-мишеней. Несмотря на преимущества использования систем CRISPR/Cas существуют некоторые препятствия внедрения технологии геномного редактирования в практику. Проблема возникновения нецелевых эффектов при редактировании генов системами CRISPR/Cas считается одной из основных. Одним из перспективных подходов к её решению является разработка новых структур эффективных модифицированных направляющих РНК

В данной работе было исследовано влияние как природных модифицированных нуклеотидов: m6A, m5C и Ψ, так и фосфорилгуанидиновых групп на эффективность и специфичность функционирования системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

В ходе работы были получены серии sgРНК и tracrРНК с разной глубиной природных модифицированных мономеров, и было установлено, что оптимизация времени реакции и глубины модификации направляющих РНК позволяет достичь наибольшей эффективности гидролиза модельных ДНК-субстратов. Кроме того, замена канонических нуклеотидов на их модифицированные аналоги в направляющих РНК приводит к повышению специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с немодифицированным вариантом.

Также были сконструированы и описаны новые химерные направляющие РНК, содержащие как единичные, так и несколько ФГ-групп. Впервые была продемонстрирована возможность формирования каталитически активных комплексов белка Cas9 с химерными направляющими РНК, содержащими ФГ-модификации. Было показано, что включение фосфорилгуанидиновых группировок в РАМ-дистальном районе направляющих РНК позволяет сохранить высокую эффективность гидролиза ДНК-субстратов и увеличить точность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

Таким образом, использование природных модифицированных нуклеотидов и фосфорилгуанидиновых групп в структуре направляющих РНК позволяет контролировать активность и повышать специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 21-64-00017 (исследования по влиянию ФГ-модификаций) и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7 (исследования по влиянию природных модифицированных нуклеотидов).

© Д. В. Прохорова, П. О. Толстова, М. С. Купрюшкин, И. С. Довыденко, И. М. Переверзев, Д. В. Пышный, Г. А. Степанов, 2022

## АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ДЛИННУЮ НЕКОДИРУЮЩУЮ РНК NEAT1\_1 ЧЕЛОВЕКА \*

Н. Е. Пукаева<sup>1</sup>, Р. К. Овчинников<sup>1,2</sup>, М. С. Кухарский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва

✉ nadya.pukaeva@mail.ru

### Аннотация

В данной работе был проведен анализ транскриптома коры головного мозга трансгенных мышей линии NEAT1\_1Tg, охарактеризовано функциональное значение дифференциально экспрессирующихся генов, а также проведен анализ изменения их экспрессии в условиях хронического стресса.

Все больше данных появляется о важной роли длинных некодирующих РНК в работе нервной системы. Некоторые из них, например, NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1), связывают с развитием ряда нейродегенеративных и психических заболеваний. При этом в большинстве случаев в мозге пациентов обнаруживается повышение уровня NEAT1. Однако до конца неясно, какую роль при этом играет NEAT1 — защитную или патогенетическую. Согласно современным представлениям, NEAT1 является стимул/стресс-зависимым транскриптом, оказывающим регуляторное действие в специфических условиях, в частности при стрессе. Для моделирования избыточности функции данной РНК была получена новая линия трансгенных мышей (NEAT1\_1Tg), экспрессирующих короткую изоформу NEAT1\_1 человека.

Целью данного исследования являлась оценка влияния повышенного уровня длинной некодирующей РНК NEAT1\_1 в нервной системе трансгенных мышей на транскриптом коры головного мозга.

На первом этапе была проведена оценка экспрессии трансгена NEAT1\_1 в нервной системе методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ ПЦР). Было показано, что трансгенная кассета экспрессируется во всех отделах нервной системы и не оказывает влияние на уровень экспрессии собственной Neat1 мыши. Далее было проведено секвенирование РНК, выделенной из коры головного мозга трансгенных и контрольных животных, с последующей оценкой функционального значения дифференциально экспрессирующихся генов ресурсами DAVID v6.8 и Enrichr. В результате было показано, что у трансгенных животных в сравнении с контрольными мышцами наблюдались изменения в экспрессии генов, участвующих в таких процессах как регуляция апоптоза, образование аксонов, межсинаптическая передача и регуляция активности рецепторов. Для подтверждения результатов, полученных при транскриптомном анализе, была проведена оценка экспрессии некоторых дифференциально экспрессирующихся генов в коре головного мозга методом ОТ ПЦР. Также было выявлено, что схожие изменения в уровне экспрессии генов наблюдаются и в спинном мозге. Далее было проанализировано изменение экспрессии выявленных дифференциально экспрессирующихся генов у трансгенных животных в условиях хронического стресса, вызванного иммобилизацией. Для части генов было зафиксировано значимое изменение экспрессии при стрессе. В частности, наблюдалось снижение уровня нейротрофического фактора Bdnf.

Таким образом можно сделать вывод о том, что эктопная экспрессия длинной некодирующей РНК NEAT1\_1 человека в нервной системе мышей приводит к изменению экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию процессов, связанных с нейрональной пластичностью, в том числе влияет на их экспрессию при хроническом стрессе.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-25-00645.

© Н. Е. Пукаева, Р. К. Овчинников, М. С. Кухарский, 2022

## РАЗРАБОТКА НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НА ГРУППУ ГЛЮТЕНИНКОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ *Vx* У *TRITICOSECALE*\*

А. С. Пырников<sup>1</sup>, Н. А. Милюкова<sup>1,2</sup>, Е. С. Полховская<sup>1</sup>, А. А. Соловьев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

<sup>2</sup>Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва

✉ andrey.pyrsikov@yandex.ru

### Аннотация

Глютенинкодирующие гены пшеницы и тритикале имеют сложную организацию ввиду наличия часто повторяющихся последовательностей на всем протяжении кодирования, что затрудняет дизайн праймеров. В данном исследовании для разработки новых маркеров была выбрана группа глютеининокодирующих генов *Vx* (*Glu-B1*). Разработанная система маркирования позволяет идентифицировать варианты аллеля *Vx* в коллекции образцов яровой гексаплоидной тритикале.

Глютенинкодирующие локусы являются достаточно сложным объектом для молекулярного маркирования из-за особенностей организации. Основные проблемы связаны с дизайном праймеров, а также с частой встречаемостью нуклеотидных последовательностей как в одном сиквенсе гена, так и в коде различных субъединиц глютеинов [1–4]. Для разработки новых маркеров в данном исследовании была выбрана группа глютеининокодирующих генов *Vx* (*Glu-B1*). В процессе биоинформатического анализа глютеининокодирующих генов групп *Ax*, *Vx*, *Dx* и *Rx* были выбраны области, специфичные только для генов группы *Vx*, причем данные области должны иметь вариабельность внутри самой группы *Vx* (инсерции либо делеции) для возможности маркирования разных вариантов аллеля. Последовательности разработанных праймеров, размер ампликонов и температура отжига представлены в таблице.

### Смоделированные праймеры

Название	Последовательность 5'-3'	Возможные варианты аллелей, размер ампликонов, пн	Рекомендуемая температура отжига, С°
FGlu 450-500/640-690	ggaagaaacactggagatc	691, 637, 505, 451	62
RGlu 450-500/640-690	ggcactcaaaacttctaaccatg		
Fglu 1	cctctggacaactacaatgtg	715, 687, 671	64
Rglu 1	tcctgattgctgccttg		
Fglu 396/351	caacctctccacagcagc	396, 352, 335, 244	65
Rglu 396/351	ctgtcctgactgttgcg		
Fglu119/101	ccaacttctgtggcaac	118, 101	65
Rglu119/101	gccttgccaccttaggc		

Первой смоделированной парой праймеров стали праймеры FGlu 450-500/640-690 и RGlu 450-500/640-690. Область прямого праймера покрывает все варианты аллелей *Vx* и фланкирует делеционный вариант размером 186 нуклеотидов. Область обратного праймера RGlu 450-500/640-690 закрывает делецию размером 186 нуклеотидов и покрывает все варианты аллеля *Vx*. При использовании данной пары праймеров амплифицируются безделеционный и делеционный варианты (637 пн и 451 пн соответственно). Обратный праймер RGlu 450-500/640-690 также имеет второе место гибридизации и позволяет идентифицировать еще одну возможную делецию. Вторая область гибридизации соответствует продуктам амплификации 691 пн и 505 пн. Аналогичный подход применялся при дизайне остальных указанных выше пар праймеров. В ходе исследования были проанализированы 28 образцов яровой гексаплоидной тритикале различного географического происхождения, аллель *Glu Vx-6* встречается у 40 % образцов; аллель *Glu Vx-17* — у 7 % образцов изученной коллекции. Аллели *Glu Vx-7* и *Glu-14* выявлены у пяти и у одного образца соответственно. Все образцы изученной коллекции, кроме одного, имеют аллели *Glu Vx-13*, *Glu Vx-7*. Проводятся полевые и лабораторные оценки технологических качеств данных образцов.

### Литература

1. Ghazy A. I., Zounouy A. I., Moustafa K. A., Al-Doss A. A. A PCR-based method for discriminating between high molecular weight glutenin subunits *Vx7* and *Vx7\** in *Triticum aestivum* L. // Plant Breeding. 2012. V. 131. P. 571–573.

\* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МК-3235.2021.5.

© А. С. Пырников, Н. А. Милюкова, Е. С. Полховская, А. А. Соловьев, 2022

- 
2. Goutam U., Tiwari R., Gupta R. K. et al. Allelic variations of functional markers for high molecular weight glutenin genes in Indian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and their correlation with bread loaf volume // *Indian Journal of Plant Physiology*. 2015. V. 20. P. 97–102.
  3. Liang X., Zhen S., Han C. et al. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the Glu-B1 locus in hexaploid wheat // *Journal of Cereal Science*. 2015. V. 43. P. 94–101.
  4. Картель Н.А., Малышев С.В., Урбанович О.Ю., Хацкевич А.А. Молекулярные маркеры в изучении хозяйственно-ценных признаков сельскохозяйственных культур // *Молекул. и прикл. генетика*. 2009. Т. 9. С. 19–27.

**РОЛЬ ДИНАМИЧЕСКИХ ТУБУЛИНОВЫХ МИКРОТРУБОЧЕК В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ АКТИВАТОРА ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ STIM2\***А. В. Раковская<sup>1</sup>, Е. И. Пчицкая<sup>1</sup>, И. Б. Безпрозванный<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Лаборатория молекулярной нейродегенерации,

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

<sup>2</sup>Юго-Западный медицинский центр Университета штата Техас, Даллас, США

✉ rakovskya.av@edu.spbstu.ru

**Аннотация**

Одним из механизмов кальциевого сигналинга в клетке является депо-управляемый вход кальция (ДУВК) [1]. ДУВК из внеклеточной среды в цитоплазму активируется при снижении концентрации кальция во внутриклеточном кальциевом депо — гладком эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Во время истощения запасов белки STIM (stromal interacting molecule) транслоцируются к клеточной мембране, где формируют кластеры и запускают вход кальция в нейрон путем взаимодействия с кальцийпроводящими каналами. Известно, что в электроневозбудимых клетках белок EB1 (end-binding) контролирует транслокацию STIM1 к местам контакта ЭР и клеточной мембраны. Ранее было показано, что гомолог STIM2, специфичный для зрелых дендритных шипиков, взаимодействует с белком EB3, и данное взаимодействие важно для формирования грибовидных дендритных шипиков. ДУВК в дендритных шипиках нейронов гиппокампа регулируется белком STIM2, и ранее было показано, что этот путь нарушен в различных мышечных моделях болезни Альцгеймера [2, 3]. STIM2 образует Ca<sup>2+</sup>-зависимый комплекс с белком EB3 через аминокислотный мотив Ser-x-Ile-Pro. Недавние исследования показали, что белок семейства EB3 крепится к положительному концу растущей тубулиновой микротрубочки (MT), которые временно входят в дендритные шипики [4]. В нейронах гиппокампа взаимодействие STIM2-EB3 важно для нормальной морфологии дендритных шипиков [5]. Тем не менее, отсутствует информация о роли взаимодействия с EB-белками в кластеризации STIM2 и движении ЭР в нейронах.

Целью данной работы является анализ размера и плотности кластеров, формируемых белками STIM2 и его вариантом с мутацией STIM2-IP/NN в сайте взаимодействия с EB-белками в клетках HEK293T, а также оценка наличия шипикового аппарата (ША, spine apparatus) — формируемой эндоплазматическим ретикулумом специализированной нейрональной органеллы в дендритных шипиках гиппокампальных нейронов в норме и при разрушении комплекса белков STIM2-EB.

Для изучения кластеров белка STIM2 был применен метод экспансионной микроскопии, позволяющий значительно увеличить разрешение в сравнении с обычной конфокальной микроскопией и визуализировать кластеры на мембране. Клетки HEK293T с конфлюэнтностью 50–70 % трансфицировались плазмидами YFP-STIM2, YFP-STIM2-IP/NN, фиксировались и затем окрашивались первичными антителами к белку GFP и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488, для усиления интенсивности флуоресценции. Согласно протоколу для экспансионной микроскопии, для обеспечения сшивки белковых молекул образца с гелем клетки обрабатывали Acryloyl-X и заливали в гель. После обработки протеиназой К гель последовательно расширяли в воде два раза. Изображения обрабатывались согласно разработанному протоколу, а затем кластеры детектировались с помощью программного обеспечения Icy и встроенного в него плагина Spot Detector. Показано, что при снижении концентрации кальция в ЭР у мутантного варианта белка STIM2-IP/NN присутствует тенденция к снижению плотности кластеров по сравнению со STIM2.

Для оценки влияния мутации связывания с EB-белками в STIM2 на ША гиппокампальные нейроны ко-трансфицировались плазмидами, кодирующими GFP и YFP-STIM2 на DIV7 и фиксировались на DIV17. После проводилось иммуноцитохимическое окрашивание антителами к белку синаптоподину и вторичными антителами Alexa Fluor 594. С помощью конфокальной микроскопии были получены изображения, характеризующие морфологию дендритов и дендритных шипиков путем визуализации флуоресценции цитозольного белка GFP, и изображения, характеризующие распределение белка синаптоподина. Нарушение взаимодействия STIM2-EB3 приводит к значительному снижению числа дендритных шипиков, содержащих шипиковый аппарат.

Таким образом, впервые продемонстрировано, что взаимодействие STIM2 и EB3 необходимо для формирования кластеров белка STIM2. Также комплекс белков STIM2-EB3 участвует в транслокации и олигомеризации STIM2. Данный комплекс STIM2-EB3 в том числе влияет на формирование ША в дендритных шипиках, что свидетельствует также о его роли в движении ЭР.

\* Исследование поддержано РФФ № 21-74-00028 (ЕП).

**Литература**

1. Zhang H. et al. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. P. 47.
2. Wegierski T. Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease // *Cell Calcium.* 2018. V. 10.
3. Sun S. et al. Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store-Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice // *Neuron.* 2014. V. 82. P. 79–93.
4. Jaworski J. et al. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity // *Neuron.* 2009. V. 61. № 1. P. 85–100.
5. Pchitskaya E. et al. Stim2-Eb3 Association and Morphology of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons // *Sci. Rep.* 2017. V. 7.



## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДЕЛОВ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ХЛОРСОДЕРЖАЩЕГО ПРОИЗВОДНОГО ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ФЛЭЧ\*

И. В. Родионов<sup>1</sup>, Е. В. Проскурнина<sup>1</sup>, Е. С. Ершова<sup>1</sup>, Е. А. Савинова<sup>1</sup>, О. А. Краевая<sup>2</sup>,  
П. А. Трошин<sup>2</sup>, Л. В. Каменева<sup>1</sup>, Н. Н. Вейко<sup>1</sup>, С. В. Костюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва

<sup>2</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

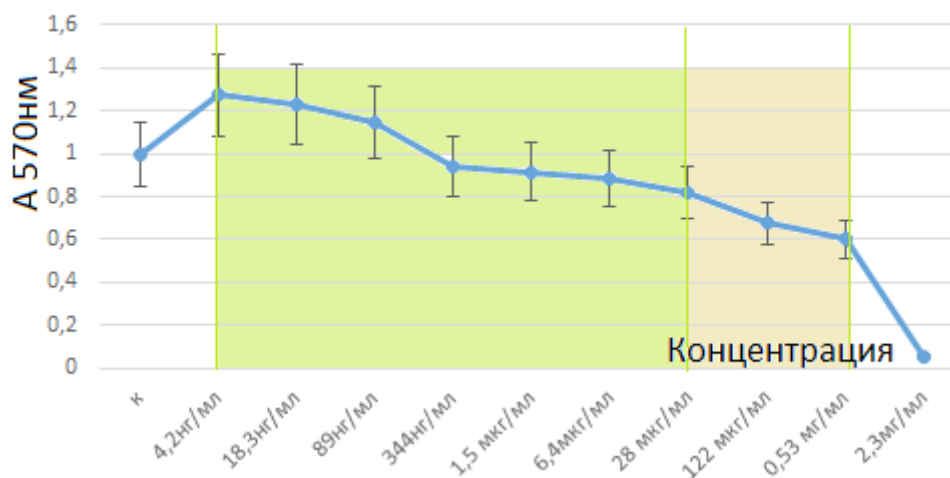
✉ savinova.ekaterina96@yandex.ru vano121099@mail.ru

### Анотация

Развитие нанотехнологий позволило медицине продвинуться далеко вперед во многих направлениях, в том числе и в фармакологии [1]. Фуллерен и его производные благодаря своей уникальной структуре и физико-химическими свойствам способны действовать и как антиоксиданты, и как прооксиданты, и в перспективе могут быть применены в качестве лекарственных препаратов [2–5]. Однако данные о биобезопасности данных веществ на сегодняшний день весьма разрознены и неоднозначны. Включение в производные фуллерена атома хлора оказывает влияние на токсичность соединения [6]. Целью данной работы являлось определение безопасности и токсичности хлорсодержащего водорастворимого производного фуллерена в отношении культивируемых фибробластов человека для оценки перспектив его дальнейшего применения.

Данная работа посвящена исследованию биобезопасности хлорсодержащего водорастворимого производного фуллерена C<sub>60</sub> молярной массой 1982 г/моль, содержащего, помимо атома хлора, остатки калиевой соли 3-фенилглутаровой кислоты. Подробности синтеза данного соединения опубликованы ранее [7]. В качестве клеток для исследования токсичности соединения использовали эмбриональные фибробласты легкого человека (ФЛЭЧ) 4-го пассажа из коллекции культур клеток ФГБНУ «МГНЦ». Клетки выращивали в 96-луночном планшете в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью теста на 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ). Метод основан на том, что NADPH-оксидазы митохондрий способны восстанавливать МТТ до пурпурных гранул формазана, количество восстановленного продукта измеряли фотометрически на приборе EnSpire Plate Reader (EnSpire Equipment, Финляндия), при длине волны при 570 нм.

Исследовали влияние водорастворимого производного фуллерена C<sub>60</sub> на ФЛЭЧ в концентрации 4,2 нг/мл — 2,3 мг/мл. Фуллерен добавляли в среду в начале культивирования ФЛЭЧ. Длительность культивирования составляла 1–24 часа. Нецитотоксичной для клеток является концентрация соединения ниже 28 мкг/мл, в концентрации 28 мкг/мл — 0,55 мг/мл оказывают повреждающее воздействие на клетки, вызывая гибель менее 50 % клеток; в концентрации выше 0,55 мг/мл соединение токсично для клеток (см. рисунок).



МТТ-тест: по оси X — концентрация фуллерена C<sub>60</sub>, содержащего атом хлора и остатки калиевой соли 3-фенилглутаровой кислоты; по оси Y — оптическая плотность при длине волны 570 нм

Таким образом, по результатам данного исследования был установлен обширный диапазон концентраций данного хлорсодержащего водорастворимого производного фуллерена, при которых это соединение не оказывает токсического воздействия на клетки человека, что в будущем позволит исследовать биологическую активность данного соединения в биобезопасных концентрациях.

#### Литература

1. Markovic Z., Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60) // *Biomaterials*. 2008. № 29(26). P. 3561–3573.
2. Kraevaya O. A., Novikov A. V., Shestakov et al. Water-soluble fullerene-based nanostructures with promising antiviral and myogenic activity // *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2020. № 56(70). P. 10203–10206.
3. Li T., Dorn H. C. Biomedical Applications of Metal-Encapsulated Fullerene Nanoparticles // *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2017. № 13(8). P. 10.1002/sml.201603152.
4. Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova et al. Antioxidant Properties of Fullerene Derivatives Depend on Their Chemical Structure: A Study of Two Fullerene Derivatives on HELFs // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019. P. 4398695.
5. Huang J., Zhou C., He J. et al. Protective effect of reduced glutathione C60 derivative against hydrogen peroxide-induced apoptosis in HEK 293T cells // *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences*. 2016. № 36(3). P. 356–363. (Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban)
6. Valentovic M.A, et al. In Vitro toxicity of 2- and 4-chloroaniline: comparisons with 4-amino-3-chlorophenol, 2-amino-5-chlorophenol and aminophenols // *Toxicol. In Vitro*. 1996. № 10(6). p. 713–20.
7. Kraevaya O.A. et al. Diversion of the Arbusov reaction: alkylation of C-Cl instead of phosphonic ester formation on the fullerene cage // *Org. Biomol. Chem*. 2019. № 17(30). p. 7155–7160.

## ВЛИЯНИЕ АМИСУЛЬПРИДА НА ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТАУ-БЕЛКА У КРЫС OXYS — МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА\*

А. Я. Родный, К. А. Молобекова, Е. М. Кондаурова, Н. А. Стефанова, Н. Г. Колосова, В. С. Науменко

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

✉ aleksandr1994rodny@gmail.com

### Аннотация

Нейролептик амисульприд значительно снижает соотношение pTau/Tau в гиппокампе у 3-месячных крыс OXYS, что также сопровождается пониженной экспрессией CDK5 — основной киназы, вовлеченной в фосфорилирование патологических тау-белков. С другой стороны, не было обнаружено улучшения обучаемости в тесте распознавания нового объекта. Полученные результаты показывают, что амисульприд оказывает влияние на тау-белок в модели болезни Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной причиной деменции по всему миру. Примечательно, что процент людей с деменцией, вызванной БА, резко возрастает с возрастом: у 3 % людей в возрасте 65–74 лет, у 17 % людей в возрасте 75–84 и у 32 % людей в возрасте старше 85 лет [1]. В то же время повышение продолжительности жизни является одним из приоритетов российской внутренней политики, поэтому развитие эффективных терапевтических стратегий против БА относится к числу крайне актуальных задач для современной медицины и нейробиологии.

Образующийся в мозге серотонин (5-НТ) является ключевым элементом во многих физиологических процессах и формах поведения. Полифункциональность серотонина связана с большим количеством рецепторов, опосредующих его действие. 5-НТ<sub>7</sub>-Рецептор — один из последних описанных 5-НТ-рецепторов. Он вовлечен в процессы формирования памяти, которые зависят от изменений в морфологии синапсов и эффективности синаптической трансмиссии. Стимуляция 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторов в гиппокампе приводит к повышению синаптической плотности и длины нейритов, которые также зависят от CDK5 — основной киназы, вовлеченной в патологическое фосфорилирование тау-белка, что поддерживается данными о вызванном ингибитором CDK5 снижении плотности дендритных шипиков, число которых повышается при активации 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторов без ингибирования CDK5. Также было показано, что эти белки физически взаимодействуют на плазматической мембране. CDK5 играет важную роль в гиперфосфорилировании тау-белка, что может указывать на вовлеченность 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторов на статус его фосфорилирования, диссоциацию и дальнейшую агрегацию при БА. Эта идея была развита из тех соображений, что конститутивная активация 5-НТ<sub>7</sub> рецепторов приводит к повышению активности CDK5 и чрезмерному фосфорилированию тау-белка с формированием нерастворимых агрегатов. И напротив, ингибирование активности 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторов его антагонистами приводит к элиминации этого эффекта [2].

Для дальнейшего подтверждения этой идеи мы исследовали эффект потенциального антагониста 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторов на гиперфосфорилирование тау-белка и на функциональное состояние серотониновой системы мозга у крыс OXYS — модели спорадической болезни Альцгеймера — формы БА, включающей 95 % всех случаев.

Эксперимент был проведен на 1-, 3- и 6-месячных крысах OXYS. Животным вводили антагонист 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторов амисульприд (Solian, Sanofi-Avensis France) в течение трех недель (ip., 3 мг/кг). После окончания введения препарата был проведен тест «распознавание нового объекта», после чего были оценены уровни мРНК с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и белков с помощью вестерн-блот-анализа.

Показано, что хроническое введение амисульприда влияет на фосфорилирование патологического тау-белка и вызывает значительное снижение соотношения pTau/Tau в гиппокампе 3-месячных крыс. Кроме того, в гиппокампе 3-месячных животных амисульприд вызвал снижение экспрессии CDK5, что не повлияло на обучение в тесте распознавания нового объекта. Однако был выявлен ожидаемый анксиолитический эффект амисульприда у 3-месячных крыс, являющегося антипсихотиком.

Кроме того, показано возраст-зависимое снижение уровня 5-НТ<sub>7</sub> рецепторов во фронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS. По данным литературы, такое снижение уровня 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторов, вероятно, связано с возрастом, а не с тау-патологией. Также было выявлено возраст-зависимое снижение уровней Tau и pTau во фронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS, по-видимому, связанное с тау-патологией у исследованных животных.

### Литература

1. Alzheimer's disease facts and figures // Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association. 2020.
2. Labus J., Rohrs K., Ackmann J. et al. Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT<sub>7</sub> receptor // Progress in neurobiology. 2020. № 101900.

\* Содержание животных было поддержано фундаментальным исследовательским проектом #FWNR-2022-0023. Исследование было поддержано Российским научным фондом, грант № 22-15-00011.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА C6D7-RBD, СПЕЦИФИЧНОГО К RBD-ДОМЕНУ S-БЕЛКА ВИРУСА SARS-COV-2\*

Я. О. Романенко, М. В. Силкина, А. С. Карцева, М. А. Марьин,  
М. А. Шкуратова, М. А. Макарова, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова

*Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболensk*

✉ [muntian.jana@yandex.ru](mailto:muntian.jana@yandex.ru)

### Аннотация

В современном мире большую роль в здравоохранении занимает разработка инновационных лекарственных препаратов, которые в свою очередь должны обладать большой клинической эффективностью и безопасностью. К таким средствам относятся препараты на основе моноклональных антител. Моноклональные антитела являются классом препаратов, которые способны точно связываться с антигеном (молекулярной мишенью) благодаря наличию специальных антигенсвязывающих участков в своей структуре. В качестве потенциальных лекарств для лечения или профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19 рассматриваются препараты на основе моноклональных антител.

**Цель исследования:** охарактеризовать человеческое моноклональное антитело C6D7-RBD.

### Материалы и методы исследования

В качестве донора выступил человек, переболевший новой коронавирусной инфекцией, иммунизированный через 6 месяцев вакциной «Спутник Лайт». Забор крови проводили на 7-е сутки после иммунизации. Сортинг плазмобластов проводили по фенотипу CD19<sup>+</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>. В качестве партнера по слиянию использовали клеточную линию K6H6/B5. Стабильная гибридома Hu-C6D7-RBD, синтезирующая человеческие моноклональные антитела к RBD домену S-белка вируса SARS-COV-2, была получена методом цитометрического сортирования и гибридомной технологии посредством электрослияния плазмобластов цельной человеческой крови донора. С первого скрининга, клонирования и до масштабирования полученная гибридная линия не потеряла свою активность. Нарработку чМКА C6D7-RBD проводили в биореакторе ReadyToProcess WAVE 25 Rocker. Культуральную жидкость, в которой культивировались гетерогрибидомы, подвергали очистке методом аффинной хроматографии на колонке с Protein G-сефарозой. Чистоту полученной иммуноглобулиновой фракции оценивали методом SDS-электрофореза по Лэммли в 10 %-м полиакриламидном геле (ПААГ).

Следующим этапом мы проверили очищенное чМКА C6D7-RBD на специфичность к RBD-домену вируса SARS-COV-2 с использованием вестерн-блот-анализа. Фракцию целевого коммерчески доступного белка RBD (his-sars2-rbd, Invivogen), в количестве 1 мкг на дорожку подвергали электрофорезу в 10 %-м ПААГ в денатурирующих условиях, после чего осуществляли горизонтальный перенос белка из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra. По окончании переноса мембрану блокировали обезжиренным молоком, после чего мембрану погружали в раствор с чМКА C6D7-RBD с концентрацией 10 мкг/мл в ФСБ. Антитела на мембране детектировали козьими антителами против IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена. Проявку осуществляли 1 % раствором диаминобензидина в ФСБ с добавлением 33 % перекиси водорода. Реакцию останавливали погружением мембраны в воду.

Определение подкласса и изотипа чМКА C6D7-RBD осуществляли с помощью иммунохроматографического экспресс-теста (Iso-Gold™ Rapid Human Antibody Isotyping Kit).

Определение аффинного взаимодействия чМКА C6D7-RBD с белком-мишенью RBD определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (PPR) на приборе BIAcore2000. Анализ проводили при температуре 25 °

\* Работа выполнена в рамках Государственного задания НИОКР 3.1.3.

## СВОЙСТВА ПОЛИЭПИТОПНЫХ ИММУНОГЕНОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМБИНАЦИИ ИЗВЕСТНЫХ ЭПИТОПОВ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ВИЧ-1 АНТИТЕЛ\*

А. П. Рудомётов<sup>1</sup>, Н. Б. Рудомётова<sup>1</sup>, А. А. Ломзов<sup>2</sup>, А. А. Ильичёв<sup>1</sup>, Л. И. Карпенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

✉ rudometov\_ap@vector.nsc.ru

### Аннотация

Вирус иммунодефицита человека является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Разработка безопасной и эффективной вакцины могла бы способствовать прекращению пандемии ВИЧ/СПИДа. В данной работе проведено исследование вторичной структуры и иммуногенных свойств трех новых полиэпитопных ВИЧ-иммуногенов. С помощью метода кругового дихроизма определена их вторичная структура. Показано, что иммунизация лабораторных животных рекомбинантными белками приводит к индукции антител, специфичных в отношении как спроектированных иммуногенов, так и тримеров поверхностного гликопротеина ВИЧ-1.

Одной из главных проблем при разработке вакцин против высоко изменчивых патогенов, в числе которых ВИЧ-1, их большое генетическое разнообразие, которое затрудняет идентификацию антигена, способного обеспечить формирование защитного иммунитета. Некоторые ВИЧ-инфицированные люди естественным образом вырабатывают широконейтрализующие ВИЧ-1 антитела, которые нацелены на более консервативные области вируса и активны в отношении большинства штаммов ВИЧ-1. При конструировании иммуногенов нужно также учитывать, что большинство защитных иммунных ответов против патогенов являются поликлональными, то есть включают комплекс нейтрализующих антител, нацеленных на несколько различных эпитопов (регионов), что и наблюдается при использовании комбинаций bnAbs. В последнее время появилось много данных как о новых bnAbs, так и о структуре их эпитопов, но до сих пор остается открытым вопрос, как индуцировать bnAbs с помощью вакцинации.

Цель данной работы заключалась в получении и исследовании иммуногенных свойств полиэпитопных ВИЧ-иммуногенов.

Ранее нами были получены три полиэпитопные конструкции, включающие комбинации *B*-клеточных эпитопов, в том числе эпитопов bNabs, и *Th*-эпитопов, а также линкерных последовательностей, соединяющих их. Были получены теоретические данные об их физико-химических свойствах. Данные варианты получили рабочие названия 6.1.2, 9.2.5 и 10.1 [1].

На следующем этапе с помощью спектроскопии кругового дихроизма были определены элементы вторичной структуры для вариантов 6.1.2 и 9.2.5. Полученные данные для варианта 6.1.2 сопоставимы с теоретически рассчитанными. Для варианта 9.2.5 результаты теоретических расчетов и экспериментальных данных не совпадают как в плане распределения а.о., вовлеченных во вторичные и неупорядоченные структуры, так и в распределении между элементами вторичных структур (см. таблицу). Для варианта 10.1 не удалось зарегистрировать спектры КД.

### Элементы вторичной структуры искусственных белков

Структура	Иммуноген			
	6.1.2		9.2.5	
	Теоретический расчет, %	Экспериментальные данные, %	Теоретический расчет, %	Экспериментальные данные, %
$\alpha$ -спирали	46,43	21,7 %	30,32	15,5 %
$\beta$ -тяжи	13,10	22,0 %	27,15	23,2 %
Поворот_I	8,93	23,6 %	9,05	18,1 %
Поворот_II	-	0,2 %	-	0,5 %
Неупорядоченные структуры	31,55	32,5 %	33,48	42,7 %

Далее очищенными препаратами иммуногенов была проведена иммунизация мышей Balb/c. У иммунизированных животных был проведен забор крови и получены сыворотки крови. Иммуноферментный анализ показал, что иммунизация лабораторных животных очищенными препаратами белков приводит к появлению антител,

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00879

© А. П. Рудомётов, Н. Б. Рудомётова, А. А. Ломзов, А. А. Ильичёв, Л. И. Карпенко, 2022

специфичных в отношении как спроектированных иммуногенов, так и тримеров поверхностного гликопротеина ВИЧ-1. Средний титр после 3-й иммунизации в отношении разработанных иммуногенов составил 1 : 125000. Таким образом, полученные полиэпитопные конструкции могут служить основой для разработки иммуногенов, фокусирующих гуморальный иммунный ответ на регионах уязвимости ВИЧ-1.

#### **Литература**

1. Рудомётов А.П., Рудомётова Н.Б., Ильичёв А.А., Карпенко Л.И. Полиэпитопные иммуногены, содержащие комбинации известных эпитопов широконейтрализующих ВИЧ-1 антител // Сб. материалов VIII междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Кольцово, 2021. С. 327.

## ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ SKQ1 НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ \*

О. О. Рыченкова, М. С. Старикова, Д. А. Жаглин

*Воронежский государственный университет*

✉ rychenkovaolga@gmail.com

### Аннотация

Окислительный стресс признается важным звеном в патогенезе ревматоидного артрита, в связи с чем представляется перспективным применение экзогенных соединений с антиоксидантной активностью с целью лечения и смягчения симптомов патологии. В роли такой молекулы способен выступать митохондриальный протектор SkQ1.

Ревматоидный артрит (РА) — системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением периферических суставов. Характерной особенностью патогенеза РА является интенсификация процессов свободнорадикального окисления (СО), которая, в свою очередь, сопровождается истощением антиоксидантной системы.

Таким образом, закономерно ожидается, что введение экзогенных антиоксидантов способно привести к коррекции процессов СО при РА. В роли подобного вещества может выступать SkQ1.

Одним из высокочувствительных методов, позволяющих оценить интенсивность свободнорадикального окисления в организме, является железоиндуцированная биохемилюминесценция (БХЛ) пероксидом водорода.

### Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы самцы белых лабораторных крыс. РА индуцировали однократным подкожным введением 100 мкл полного адьюванта Фрейнда в подушечку лапки задней конечности.

Экспериментальные животные были разделены на три группы: контроль, крысы с РА без лечения и животные, получавшие соединение путем ежедневной внутривнутрибрюшинной инъекции с 7-го дня развития патологии в дозировке 1250 нмоль/кг массы тела. На 14 день после начала эксперимента осуществляли вскрытие животных под наркозом и изъятие необходимого биологического материала.

В качестве показателей БХЛ измеряли светосумму (S), интенсивность максимальной выпячки ( $I_{\max}$ ), отражающих интенсивность протекания процессов СО в образце, и тангенс угла наклона кинетической кривой ( $\text{tg}\alpha_2$ ), характеризующий активность общей антиоксидантной защиты. Регистрацию параметров производили в течение 30 секунд на приборе БХЛ-07 с программным обеспечением. Данные анализировали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты

Было установлено, что развитие патологии сопровождалось повышением показателей БХЛ. Значение  $I_{\max}$  возросло: в сердце — в 1,3 раза, в сыворотке крови — в 1,5 раза, в мышцах — в 1,4 раза, в печени — в 1,3 раза. Параметр S увеличился в 1,5 раза в сердце и в 1,3 раза в сыворотке крови, мышцах и печени;  $\text{tg}\alpha_2$  также возрастал в тканях: в сердце — в 1,2 раза, в сыворотке крови — в 1,7 раз, в мышцах — в 1,4 раза, в печени — в 1,3 раза.

При введении SkQ1 отмечалось снижение измеряемых параметров по сравнению с животными с РА. Показатель  $I_{\max}$  уменьшился в 1,1 раза в сердце и мышцах, в 1,5 раза в сыворотке крови и в 1,6 раза в печени. Значение S снизилось в 1,2 раза в сердце и сыворотке крови и в 1,1 раза в мышцах. Параметр  $\text{tg}\alpha_2$  уменьшился в 1,4 и 1,2 раза в мышцах и печени соответственно. Изменения в остальных тканях были незначительными.

### Выводы

Установлено, что введение SkQ1 способствовало сдвигу показателей БХЛ в сторону нормальных значений, что, по-видимому, связано со снижением интенсивности свободнорадикальных процессов под воздействием исследуемого соединения.

## ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ФОРМИРОВАНИЮ АМИЛОИДОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОНКОГЕНЕЗОМ\*

М. В. Рябина<sup>2</sup>, А. А. Зелинский<sup>2</sup>, А. А. Рубель<sup>2,3</sup>, Ю. О. Чернов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Технологический институт Джорджии, Атланта, США

<sup>2</sup>Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

✉ marina.ryabinina.v@gmail.com

### Аннотация

Амилоиды являются неразветвленными белковыми фибриллами. Данные структуры участвуют в патогенезе ряда заболеваний (амилоидозов) человека и животных. К амилоидозам относят неизлечимые нейродегенеративные и прионные заболевания, а также некоторые онкологические патологии. С каждым годом появляется все больше данных о способности формировать амилоиды разными белками, что в дальнейшем поможет раскрыть их роль в патогенезе. Однако вклад амилоидных структур в развитие злокачественных образований мало изучен. В данной работе приведены данные по первичному скринингу некоторых транскрипционных факторов человека на способность к формированию амилоидов. Скрининг проводился с помощью дрожжевой модели.

В настоящий момент у человека выявлено около 40 различных белков, которые связаны с развитием более 70 амилоидных заболеваний (амилоидозов). Наиболее известными амилоидозами являются болезни Альцгеймера и Паркинсона, хорея Гентингтона, диабет II типа, прионные заболевания. С амилоидами связывают также одну из основных причин прерывания беременности (преэклампсию), системные амилоидозы, некоторые формы онкологических заболеваний. Известны не только патологические амилоиды, но и функциональные, например участвующие в формировании биопленок бактерий, поддержании долговременной памяти у беспозвоночных, формировании меланина у человека. С каждым годом список белков с подтвержденными амилоидогенными свойствами увеличивается, что говорит о потенциально более широком разнообразии амилоидогенных белков, нежели известно сейчас. В частности, в рамках исследований, проводимых в Научной лаборатории биологии амилоидов СПбГУ совместно с лабораторией под руководством Михаила Шермана (Ариэльский университет, Израиль), было сделано предположение, что некоторые транскрипционные факторы человека, вовлеченные в онкогенез, могут формировать амилоидные структуры. Для пяти белков предположение было подтверждено с помощью биоинформатического алгоритма ArchCandy [1].

В ходе данной работы мы проанализировали амилоидогенный потенциал при повышенной экспрессии генов исследуемых транскрипционных факторов *in vivo* в дрожжевой модели (*Saccharomyces cerevisiae*) при помощи флуоресцентной микроскопии и разработанной нами ранее дрожжевой тест-системы [2]. Для индукции сверхэкспрессии использовали плазмиды, содержащие гены изучаемых белков, слитые с репортерными генами. Мы также проанализировали наблюдаемые в дрожжевых клетках скопления отобранных транскрипционных факторов с помощью метода SDD-AGE для выявления устойчивости к ионному детергенту — лаурилсаркозилату натрия. Два из пяти транскрипционных фактора проявили устойчивость к данному детергенту. Далее планируется исследовать амилоидные свойства белков *in vitro* и в культуре клеток человека (HEK293T), а также исследовать связь амилоидной агрегации исследуемых белков с развитием онкологических заболеваний.

### Литература

1. Ahmed A.B., Znassi N., Château M., Kajava A.V. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimer's & Dementia*. 2015. Vol. 11. № 6. P. 681–690.
2. Chernoff Y.O., Grizel A.V., Rubel A.A. et al. Application of yeast to studying amyloid and prion diseases // *Advances In Genetics*. 2020. Vol. 105. № 7. P. 308–314.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-14-0014, а также Санкт-Петербургского государственного университета (проект №93025998).



## ВЫДЕЛЕНИЕ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b С ПОМОЩЬЮ АМФИФИЛЬНОГО ПОЛИМЕРА СМА\*

Д. В. Савенкова<sup>1</sup>, Л. Ф. Булатова<sup>1</sup>, М. И. Камалов<sup>1</sup>, Т. И. Абдуллин<sup>1</sup>,  
И. А. Макаренко<sup>1</sup>, Р. Г. Киямова<sup>1</sup>, М. В. Богданов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup>Медицинская школа МакГоверн, Хьюстон, США

✉ darina.sava1@gmail.com

### Аннотация

Мембранные белки (МБ) представляют примерно 60 % всех мишеней для фармацевтических препаратов [1]. Изучение их структуры имеет важное значение для улучшения терапии многих заболеваний. Однако ввиду сложностей экстракции и очистки прогресс в структурных исследованиях МБ очень медленный. Это подтверждается низким количеством разрешенных структур МБ (< 1 %) по сравнению с цитозольными белками [2]. Одной из главных причин является гидрофобность и функциональная зависимость МБ от липидного окружения. Поэтому поиск подходов для выделения и очистки МБ в гидрофильном и стабильном состоянии, обусловленным их нативным липидным микроокружением, является актуальной задачей. В данной работе мы использовали сополимер стирола и малеиновой кислоты (СМА) для выделения натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b из плазматической мембраны клеток рака яичника.

Транспортер NaPi2b является трансмембранным белком, который участвует в поддержании фосфатного гомеостаза. NaPi2b был идентифицирован как антиген для терапевтических антител МХ35, направленных для терапии рака яичника [3]. Накопление терапевтических антител против NaPi2b именно в солидных опухолях, но не в здоровой ткани, делает NaPi2b (антиген МХ35) потенциальной опухоль-специфической мишенью. Поэтому выделение и очистка NaPi2b необходима для изучения его структуры и особенностей распознавания моноклональными антителами.

Важное значение в очистке NaPi2b имеет имитация нативного липидного микроокружения, которое благоприятствует сохранению стабильности и функциональной активности транспортера. Классические методы выделения МБ, которые основаны на детергентах, нарушают такие белково-липидные взаимодействия [4]. Одним из решений этой проблемы является солюбилизация плазматической мембраны со СМА, которая приводит к спонтанному образованию липидных нанодисков, состоящих из липидного бислоя клетки, окруженного поясом амфипатических сополимеров, что повышает стабильность МБ и позволяет проводить исследования структуры и функции в нативной липидной среде [4, 5].

В работе мы использовали клетки рака яичника OVCAR-8, трансфицированные рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1+/NaPi2b/6His, экспрессирующей полноразмерный NaPi2b с гистиридиновым тагом. Выделение и солюбилизацию NaPi2b проводили путем взаимодействия СМА (3:1 стирол : малеиновый ангидрид) с мембранной фракцией клеток OVCAR-8 в течение двух часов при 25°C в соотношении полимер : мембрана 10 : 1 по массе. Очистку NaPi2b в составе липидных нанодисков проводили с использованием сорбента никель-нитрилотриуксусной кислоты. Наличие липидных нанодисков с NaPi2b оценивали с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС).

Результаты анализа ДРС показали наличие пиков в пределах 8-10 нм, что свидетельствует об образовании липидных нанодисков с NaPi2b, соответствующих стандартному размеру нанодисков, получаемых при солюбилизации биомембран со СМА (3:1) [4]. В контрольных образцах пиков в таком диапазоне не наблюдалось. Эффективность солюбилизации мембранной фракции клеток OVCAR-8 со СМА была подтверждена с помощью Вестерн-блот-анализа моноклональными антителами L2(20/3) против эпитопа МХ35.

Полученные липидные нанодиски открывают возможности для изучения структуры и функции транспортера NaPi2b в нативном липидном окружении опухолевых клеток, что позволит разрабатывать более специфические терапевтические препараты для лечения рака яичника.

### Литература

1. Yin H. et al. Drugging Membrane Protein Interactions // Annu Rev Biomed Eng. 2015. V. 18.
2. Lluis M.W. et al. Protein engineering methods applied to membrane protein targets // Protein Engineering. Des & Selec. 2012. V. 26.

\* Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030 и при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00166).

3. Kiyamova R. G. et al. Identification of phosphate transporter NaPi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach // *Biopolymers Cell*. 2008. V. 24.
4. Overduina M. et al. Advancing membrane biology with poly(styrene-co-maleic acid)-based native nanodiscs // *Europ. Polymer Journal*. 2019. V. 110.
5. Chen Angela et al. Nanodiscs // *Frontiers in Bioeng. and Biotech*. 2020. V. 8.

## ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛОМА ГИППОКАМПА ПРИ РАЗВИТИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ\*

Е. Д. Савина<sup>1</sup>, О. А. Снытникова<sup>1</sup>, Н. Г. Колосова<sup>1</sup>, Д. В. Телегина<sup>2</sup>, Ю. П. Центалович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

✉ kate.sormacheva@gmail.com

### Аннотация

Метод ЯМР-спектроскопии применяется для выявления метаболических предпосылок и маркеров развития болезни Альцгеймера (БА). В работе проведен сравнительный количественный анализ метаболитов мозга крыс OXYS — модели преждевременного старения, одним из проявлений которого становится развитие комплекса признаков БА.

Метаболомный подход находит широкое применение в изучении различных заболеваний, поскольку позволяет с высокой точностью определять молекулярные механизмы патологий и выявлять их потенциальные биомаркеры. Важными инструментами в подобных исследованиях являются животные модели — экспериментальные модели заболеваний человека, позволяющие получить знания, необходимые для понимания механизмов биохимических процессов, протекающих в организме в норме и патологии, которые можно в дальнейшем использовать для диагностики, профилактики и терапии заболеваний. Болезнь Альцгеймера (БА) — самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое становится причиной деменции на фоне атрофических изменений мозга. Эффективных способов профилактики и лечения БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза заболевания. Использование животной модели — крыс OXYS, для которых характерны ранние формы заболевания с развитием всех ключевых патогенетических и «клинических» признаков БА, позволяет изучать доклинические стадии заболевания.

В данной работе метод ЯМР применяется для метаболомного профилирования мозга с целью выявления наиболее перспективных с прогностической точки зрения биомаркеров — низкомолекулярных метаболитов, отражающих нарушения в метаболических циклах при развитии признаков БА у крыс OXYS в «доклинический» период, предшествующий развитию признаков БА (в возрасте 20 дней), в период их манифестации (3 мес.) и активной прогрессии (18 мес.). Крысы линии Wistar того же возраста были использованы в качестве контроля. Для 59 метаболитов мозга установлены диапазоны варьирования и среднее значение концентраций. Анализ полученных данных позволил выявить основные метаболические закономерности при старении, вовлеченные в пути энергетического метаболизма и метаболические сдвиги нейротрансмиттеров. Данные демонстрируют увеличение концентрации тормозных нейротрансмиттеров (ГАМК-глицин) и снижение возбуждающих (глутамат), у крыс OXYS изменение этих метаболитов значительно ускоряется. В совокупности эти сдвиги в метаболизме нейротрансмиттеров с возрастом могут нарушать передачу нейронов и приводить к потере памяти.

\* Работа выполнена при поддержке РФФ (проект 22-24-20035).

## ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО ПРОИЗВОДНОГО ФУЛЛЕРЕНА F3-52 НА УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ ФЛЭЧ\*

Е. А. Савинова<sup>1</sup>, Е. В. Проскурнина<sup>1</sup>, Е. С. Ершова<sup>1</sup>, И. В. Родионов<sup>1</sup>, О. А. Краевая<sup>2</sup>,  
П. А. Трошин<sup>2</sup>, Л. В. Каменева<sup>1</sup>, Н. Н. Вейко<sup>1</sup>, С. В. Костюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва

<sup>2</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

E-mail:savinova.ekaterina96@yandex.ru

### Аннотация

В живой клетке активные формы кислорода (АФК) образуются в цитоплазме, на поверхности клеточной мембраны и в ядре. АФК участвуют в реализации многих клеточных процессов таких, как пролиферация, апоптоз и межклеточная сигнализация. Нарушение внутриклеточного гомеостаза АФК может вызывать клеточную гибель или повреждение клеток. Предполагается, что наносоединение F3-52 может рассматриваться как регулятор внутриклеточного гомеостаза АФК [1].

В данной работе исследовали наносоединение F3-52 — водорастворимое производное фуллерена C<sub>60</sub> с заместителями: молекулой хлора и молекулами 3-фенилгидроглутарат калия. Соединение в двух разных безопасных для клеток концентрациях инкубировали с клеточной культурой ФЛЭЧ (фибробласты легкого эмбриона человека) в 96-луночных планшетах, промывали фосфатным буфером и обрабатывали раствором H<sub>2</sub>DCFH-DA (dichlorodihydrofluoresceindiacetate), который быстро проникает через клеточные мембраны в цитозоль, где гидролизует до DCFH гидролазами клетки. Нефлуоресцирующий DCFH является чувствительным внутриклеточным маркером окислительного стресса, окисляясь радикалами АФК до интенсивно флуоресцирующего DCF. Анализировали уровень флуоресценции с использованием планшетного ридера (при  $\lambda_{\text{ex}} = 503$  нм и  $\lambda_{\text{em}} = 524$  нм (EnSpire Equipment, Турку, Финляндия)).

Было выявлено, что при добавлении к клеткам производного фуллерена F3-52 в концентрации 28 мкг/мл наблюдается статистически достоверное снижение ( $\approx$  на 40 %) уровня АФК через 1 и 3 часа, а в концентрации 18,3 нг/мл — наблюдается тенденция к снижению уровня АФК на (12–18) % и через 1, и через 3 часа.

Мы исследовали процессы, происходящие в клетках после взаимодействия с соединением F3-52. Данное соединение фуллерена способно связывать АФК, но одновременно может запускать процесс синтеза АФК в клетке, что может нивелировать снижение уровня АФК производным фуллерена. При этом снижение уровня АФК в клетках является результирующей составляющей разницы в активации синтеза свободных радикалов в клетках после действия фуллерена и связывания свободных радикалов исследуемым соединением. Генерация активных форм кислорода митохондриями происходит при синтезе аденозинтрифосфата (АТФ) в результате окислительного фосфорилирования. Усиление окислительных процессов при действии фуллерена в митохондриях может способствовать увеличению уровня АФК. NADPH-оксидазы также являются продуцентом физиологических количеств АФК в клетках. Одной из экспрессирующихся в фибробластах NADPH-оксидаз является NOX4, экспрессия которого регулируется на уровне гена.

Было проведено исследование экспрессии NOX4 на уровне гена и белка в клетках (ФЛЭЧ) при действии соединения F3-52. При действии на клетки фуллерена F3-52 в концентрации 18,3 нг/мл, 28 мкг/мл возрастает уровень экспрессии NOX4 в 1,5–2,8 раз на уровне гена и белка в клетках через 24–72 часа после начала инкубации с соединением.

Повышение уровня экспрессии белка NOX4 через 24 часа, обосновывает возрастание уровня АФК в клетках через 1–3 суток после добавления этого соединения к ФЛЭЧ.

Таким образом, исследованное соединение может рассматриваться как потенциальный антиоксидант. Однако через 24–72 часа культивирования ФЛЭЧ в присутствии OKR-352 наблюдается повышение уровня экспрессии гена и белка NOX4, что приводит к активному синтезу АФК в клетках и к возможному развитию «позднего» повреждающего эффекта соединения на клетки. Вероятно, добавление фуллерена OKR-352 вместе с ингибиторами NOX4 может привести к пролонгированному антиоксидантному действию соединений.

### Литература

1. Chistyakov V. A., Smirnova Y. O., Prazdnova E. V., Soldatov A. V. Possible mechanisms of fullerene C<sub>60</sub> antioxidant action // BioMed research international. 2013. 821498.

**ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА АКТИВАЦИЮ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ A549\***

Ю. И. Савиновская, А. А. Нуштаева, А. В. Савельева, В. В. Морозов,  
Е. И. Рябчикова, Е. В. Кулигина, В. А. Рихтер, Д. В. Семенов

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

✉ yulya\_savinovskaya@mail.ru

**Аннотация**

Получены препараты внеклеточных везикул крови здоровых доноров. Исследовано изменение экспрессии генов в клетках аденокарциномы легких человека A549 под действием внеклеточных везикул крови методом высокоэффективного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq 1500.

Внеклеточные везикулы, такие как экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца, доставляют биологически активные молекулы клеток-доноров к клеткам-реципиентам, модулируя в последних физиологические и патологические процессы.

Однако молекулярные механизмы процессов, активируемых или подавляемых в клетках-реципиентах при взаимодействии с внеклеточными везикулами, в настоящее время исследованы частично.

Целью данной работы является анализ наборов РНК препаратов внеклеточных везикул и анализ изменений уровней РНК в клетках линии A549 под действием препаратов внеклеточных везикул крови человека.

Для выделения и очистки внеклеточных везикул крови человека использовали метод последовательного центрифугирования при 1 200g, 16 000g и три этапа ультрацентрифугирования при 160 000g.

По данным анализа траектории наночастиц (НТА) установлено, что полученные препараты содержат несколько субпопуляций частиц с гидродинамическим диаметром ~85, 155, 255 и 350–400 нм. Из данных просвечивающей электронной микроскопии установлено, что препараты внеклеточных везикул крови (фракции 160 000 g) представлены наборами частиц, размер которых варьирует в диапазоне от 50 до 150 нм.

Жизнеспособность клеток аденокарциномы легких A549, инкубированных в присутствии внеклеточных везикул крови, анализировали методом МТТ-теста. Было установлено, что препараты внеклеточных везикул не влияют на жизнеспособность и метаболическую активность клеток человека через 48 и 72 ч инкубации. Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что внеклеточные везикулы крови не вызывают апоптотических изменений мембран клеток A549 и не оказывают существенного влияния на пролиферацию. При инкубации клеток A549 с ковалентно мечеными препаратами внеклеточных везикул, реактивным аналогом флуоресцеина FITC, везикулы захватываются и интернализуются в цитоплазматических структурах клеток.

По данным массового параллельного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 1500 установлено, что большинство мРНК внеклеточных везикул кодирует основные цитоплазматические белки клеток крови человека: гемоглобин, ферритин, тимозин бета, актин, рибосомальные белки и др. По результатам анализа Enrichr набор из 200 мажорных мРНК внеклеточных везикул обогащен РНК, транскрипция которых контролируется транскрипционными факторами: RBMX, NFKB1, SP1, TAF7, MYC, NELFE и др. Кроме того, в наборе значительно увеличился вклад мРНК, кодирующих белки циркулирующих внеклеточных везикул, включая экзосомы, внеклеточные везикулы и внеклеточные органеллы.

С использованием секвенирования на платформе Illumina HiSeq 1500 проведен анализ изменения экспрессии генов в клетках аденокарциномы легких A549 под действием внеклеточных везикул крови. Установлено, что через 6 ч инкубации клеток A549 с внеклеточными везикулами крови происходит изменение экспрессии генов, контролируемых транскрипционным фактором NF-kB, а также генов регуляции апоптотического каскада, мембран эндосом и внеклеточных везикул.

Гены вторичного ответа, экспрессия которых активируется к 24 ч инкубации клеток A549 с внеклеточными везикулами, контролируются не только NF-kB, но и такими факторами транскрипции, как HIF-1 $\alpha$ , SP1, TP53, STAT3, ATF4 и др. Наши данные указывают на то, что HIF-1 $\alpha$  активирует экспрессию ряда генов: VEGFA, EGLN3, CDH1 и др., которые участвуют в ответе на гипоксию, гликолизе, эпителиально-мезенхимальном переходе раковых клеток.

\* Работа поддержана финансированием по государственному проекту 121030200173–6 ИХБФМ СО РАН.

Таким образом, вторичный ответ клеток A549 на препараты внеклеточных везикул включает в себя активацию генов, контролируемых транскрипционным фактором HIF-1 $\alpha$ , которые в свою очередь активируют такие процессы, как ответ на гипоксию, mTOR-сигнальный путь, гликолиз, ангиогенез и др.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых терапевтических средств на основе мембранных структур — экзосом и микровезикул крови человека.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КИНАЗ IKKb, JAK2, FLT4 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ КАЛЬЦИЕВУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГИППОКАМПА\*

М. О. Савюк, М. С. Гавриш, М. В. Ведунова, Е. В. Митрошина

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

✉ mary.savuyk@bk.ru

### Аннотация

Ишемическое повреждение головного мозга остается одной из основных причин гибели людей по всему миру. Ключевым повреждающим фактором ишемии является гипоксия. Исследование способов адаптации клеток головного мозга к гипоксии может быть использовано для разработки новых фармакологических препаратов, показанных при терапии ишемического повреждения.

Ранее было показано, что фармакологическое ингибирование киназ IKKb, JAK2 и FLT4 оказывает нейропротекторное действие *in vitro* и способствует сохранению активности нейрон-глиальной сети после гипоксического повреждения [1, 2]. Фармакологические ингибиторы могут влиять не только на целевой фермент, а оказывать действие на ряд родственных белков. В настоящей работе для анализа роли киназ-мишеней в адаптации нервных клеток к кислородной депривации для селективного постоянного ингибирования киназ была использована система редактирования CRISPR/Cas. Трансфекция CRISPR/Cas-конструктом проводилась на 1-й день культивирования *in vitro* (DIV) первичных культур гиппокампа. Использовали 1,5 мкг целевой плазмиды и 1,5 мкг плазмиды, кодирующей флуоресцентный белок mCherry для визуализации трансфицированных клеток. В качестве трансфекционного агента использовали липофектамин 2000 (Invitrogen, USA). Моделирование острой гипоксии осуществляли согласно ранее разработанному протоколу на 14 DIV [3]. Особенности функциональной метаболической кальциевой активности клеток первичных культур исследовались с помощью методики кальциевого имиджинга с использованием кальциевого сенсора Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB1) (ThermoFisher, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 800 (Zeiss, Германия). Проводили анализ кальциевых осцилляций и оценивали следующие показатели: количество клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, коэффициент корреляции кальциевой активности между всеми клетками в культуре, число функциональных связей на одну клетку [4].

В норме культура нервных клеток гиппокампа является высококоррелированной культурой, обладающей большим числом активных клеток (уровень корреляции  $0,31 \pm 0,04$ , количество активных клеток  $46,8 \pm 2,1$  %). Эпизод острой гипоксии приводил к снижению числа работающих клеток до  $17,3 \pm 5,2$  % и уменьшал связность функциональных нейрон-глиальных сетей (степень корреляции кальциевой активности  $-0,13 \pm 0,04$ ). Нокаут киназ Ikkb и FLT4 с помощью Crispr/Cas позволял сохранить количество активных клеток, степень корреляции и число функциональных связей между клетками после гипоксии. Нокаут киназы Jak2, напротив, приводил к снижению числа функционально значимых связей как в целом в культуре, так и между трансфицированными клетками (интактные —  $523,17 \pm 121,69$ , Crispr/Cas Jak2  $32,25 \pm 4,33$  связей на клетку), а также к снижению степени корреляции активности в культурах, трансфицированных конструктами Crispr/Cas в 2,34 раза по сравнению с интактной группой.

### Литература

1. Mitroshina E.V. et al. Neuroprotective effect of kinase inhibition in ischemic factor modeling *in vitro* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22. № 4.
2. Mitroshina E. v. et al. Identification of Kinome Representatives with Neuroprotective Activity // Neurochemical Journal. 2020. Vol. 14. № 4. P. 394–407.
3. Shishkina T. v. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) counteracts hypoxic damage to hippocampal neural network function *in vitro* // Brain Research. 2018. Vol. 1678. P. 310–321.
4. Kustikova V. et al. CalciumCV: Computer vision software for calcium signaling in astrocytes // Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics). 2018. Vol. 11179 LNCS.

\* Работа выполнена в рамках гранта РФФ 18-75-10071-п.

© М. О. Савюк, М. С. Гавриш, М. В. Ведунова, Е. В. Митрошина, 2022

**МЕТОД ДЕКОНТАМИНАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР\***

А. В. Сагайдак, С. В. Ворона, Т. А. Григорьева

*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),  
НИИ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург*✉ [aleksandrasagaidak@yandex.ru](mailto:aleksandrasagaidak@yandex.ru)**Аннотация**

Одним из основных факторов получения достоверных результатов при проведении исследований с использованием клеточных линий является чистота культуры, поскольку контаминация приводит к изменению морфологии клеток и их функционирования. В работе подобраны условия использования антибиотика из группы фторхинолонов для деконтаминации опухолевых клеток, характеризующихся микоплазменным заражением.

При осуществлении научно-исследовательской деятельности важную роль играет качество используемого биологического материала, в том числе клеточных линий. Контаминация клеток приводит к изменению их структуры и функции, что становится причиной получения недостоверных результатов. Кроме того, наличие зараженных клеточных культур может привести к перекрестной контаминации чистых образцов и потере важного клеточного материала. Соответственно, необходимым условием использования культур становится их проверка на предмет заражения патогенными микроорганизмами, а в случае обнаружения контаминации — своевременное лечение.

В случае эукариотических клеточных культур может происходить заражение грибами, простейшими, вирусами и бактериями. Наиболее распространенным контаминантом являются представители микоплазм, отличительное свойство которых — отсутствие клеточной стенки.

Целью работы являлся подбор условий для эффективной и безопасной деконтаминации клеточных линий в лабораторных условиях.

Использовали два штамма аденокарциномы легкого человека H1299, один из которых был подвергнут заражению.

Для подтверждения природы контаминанта штаммы обрабатывали ядерным красителем Hoechst33342, клетки визуализировали при помощи имиджинговой системы Operetta CLS™ (Perkin Elmer).

Рассматривали антибиотики четырех групп: пенициллин, амфотерицин В, гентамицин и ципрофлоксацин.

Эффективность препаратов определяли методом оптического микроскопирования по наличию контаминанта в межклеточном пространстве. Безопасность антибиотиков для клеточной культуры оценивали, сравнивая скорость роста здоровых клеток в присутствии различных концентраций препаратов.

В результате работы для всех препаратов определен диапазон безопасных концентраций, эффективность против микоплазмы подтвердил ципрофлоксацин. Использование ципрофлоксацина в концентрации 20 мкг/мл обеспечило полную очистку клеток от заражения при отсутствии влияния на жизнеспособность, морфологию и скорость роста клеток аденокарциномы легкого.



## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ МИКРОРНК МОЧИ КАК МАРКЕРЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ КАСТРАЦИОННО-РЕЗИСТЕНТНОГО РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\*

М. М. Сайткулова<sup>1,2</sup>, О. Е. Брызгунова<sup>2,3</sup>, И. А. Остальцев<sup>3</sup>, П. П. Лактионов<sup>2,3</sup>, М. Ю. Коношенко<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск

✉ m.saitkulova@g.nsu.ru

### Аннотация

Внеклеточные микроРНК обладают высоким потенциалом в качестве диагностических маркеров рака предстательной железы (РПЖ) и высокоагрессивной кастрационно-резистентной формы (КРРПЖ) в частности. Было выполнено исследование уровня экспрессии микроРНК в составе внеклеточных везикул и бесклеточной фракции мочи больных гормончувствительным РПЖ и КРРПЖ. На основе полученных данных был сформирован алгоритм, позволяющий диагностировать 100 % больных КРРПЖ.

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных видов злокачественных новообразований у мужчин и занимает 2-е место по заболеваемости и 5-е место по смертности, как в России, так и по всему миру. В настоящее время андрогендепривационная терапия (АДТ) является стандартом лечения пациентов с наличием первично выявленных отдаленных метастазов, а также с прогрессированием заболевания после первичного лечения. Тем не менее, у большинства больных, получающих АДТ, наблюдаются дальнейшее прогрессирование заболевания и развитие тяжело поддающегося лечению кастрационно-резистентного рака предстательной железы (КРРПЖ) [1]. Пятилетняя выживаемость пациентов с локализованным (Т1, Т2) и регионально распространенным (Т3, Т4а) РПЖ составляет > 99 %, с распространенным (Т4b) — 31 %, в то время как медиана выживаемости больных КРРПЖ варьируется от 9 месяцев до 3 лет.

На сегодняшний день существует острая необходимость в разработке высокоспецифичных маркеров с достаточным уровнем чувствительности, которые могли бы использоваться для ранней диагностики КРРПЖ и своевременной корректировки лечения. Жидкая биопсия на основе оценки экспрессии внеклеточных микроРНК является быстро развивающейся областью с потенциалом для успешного использования в клинической диагностике онкологических заболеваний, РПЖ в частности. МикроРНК — короткие некодирующие РНК, длиной 18-25 нуклеотидов, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции белок-кодирующих генов. Внеклеточные микроРНК присутствуют в различных биологических жидкостях организма: кровь, моча, слюна, спинномозговая жидкость; стабильны к нуклеазам и удобны в работе. Их появление может быть связано как с гибелью и лизисом клеток, так и с активной секрецией живыми клетками. Как показывают многочисленные исследования, микроРНК вовлечены во все ключевые этапы развития РПЖ, а также участвуют в регуляции биосинтеза стероидных гормонов [1].

В представленной работе было выполнено исследование уровня относительной экспрессии семи различных микроРНК: miR-19b, -30e, -31, -92a, -125b, -200b, -205a, -375, -660 в составе внеклеточных везикул (ВВ) и бесклеточной фракции (БкФ) мочи больных гормончувствительным раком предстательной железы (ГЧРПЖ) и КРРПЖ (по 10 доноров в каждой группе). БкФ мочи была получена методом последовательного центрифугирования, сначала на скорости 1200 об/мин, далее при 17000 g. ВВ мочи были получены методом агрегации-преципитации с использованием полиэтиленгликоля и декстрана. МикроРНК ВВ и БкФ мочи были выделены с использованием стекловолокнистых сорбентов в присутствии октановой кислоты. Относительная экспрессия микроРНК была оценена методом stem-loop RT-PCR. Статистическую обработку данных проводили в программе MedCalc Statistical Software.

С помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA были выявлены дифференциально-экспрессированные пары микроРНК — 16 пар микроРНК ВВ и 17 пар микроРНК БкФ. На основе полученных результатов были сформированы диагностические алгоритмы: для микроРНК ВВ мочи — состоящий из трех пар микроРНК (30/31, 92/125, 125/200) и позволяющий диагностировать 90 % больных КРРПЖ; для микроРНК БкФ мочи — состоящий из трех пар микроРНК (19/200, 19/205, 200/205) и позволяющий диагностировать больных КРРПЖ с точностью 100 %.

### Литература

1. Konoshenko M.Y. miRNAs and androgen deprivation therapy for prostate cancer / M. Y. Konoshenko, O. E. Bryzgunova, P. P. Laktionov // Biochem. Biophys. Acta Rev. Cancer. 2021. Т. 1876. № 2.

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ СОЗДАНИЯ СПЕЦИФИЧНОЙ И РЕГУЛИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9\*

Л. В. Саковина, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина

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

✉ kodi99@list.ru

### Аннотация

В данной работе проведено сравнительное исследование эффективности и специфичности работы CRISPR/Cas9 системы, содержащей модифицированные направляющие РНК. Создана система, содержащая фоторасщепляемые модифицированные направляющие РНК, действие которой может быть остановлено путем облучения УФ-светом.

В настоящее время системы CRISPR/Cas, заимствованные от адаптивного механизма бактерий, широко используются для создания молекулярно-биологических инструментов, в частности технологии геномного редактирования. Актуальными задачами в области геномного редактирования на основе системы CRISPR/Cas9 являются уменьшение побочных эффектов (off-target effects) и возможность регуляции активности системы. С этой целью было предложено использовать химически модифицированные направляющие РНК. Использование химического синтеза позволяет создавать направляющие РНК, содержащие модифицированные нуклеотиды или ненуклеотидные звенья и модификации в заданных положениях олигонуклеотидной цепи.

Целью данной работы был синтез химически модифицированных направляющих РНК, в том числе и содержащих фоторасщепляемые линкеры, и исследование эффективности расщепления модельной ДНК системами CRISPR/Cas9 с их участием.

Было проведено исследование влияния замены природных рибонуклеотидов на модифицированные рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды в составе направляющих РНК на их устойчивость к действию нуклеаз, эффективность и специфичность действия CRISPR/Cas9 системы с их участием в модельной системе, содержащей плазмидную ДНК или короткий синтетический ДНК-дуплекс. Были получены серии 2'-О-метил- и 2'-фтормодифицированных направляющих РНК, а также серии направляющих РНК, содержащих LNA-нуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды в определенных положениях олигонуклеотидной цепи, а также их 3'-флуоресцеинсодержащие аналоги.

Исследование устойчивости модифицированных направляющих РНК к действию нуклеаз проводили в модельной системе, содержащей эмбриональную телячью сыворотку. LNA и 2'-фтормодифицированные crRNA обладали наибольшей устойчивостью к действию нуклеаз.

Сравнительное исследование эффективности расщепления плазмидной ДНК, содержащей участок для связывания направляющей РНК и прилегающую к нему PAM последовательность, системой CRISPR/Cas9 с участием модифицированных направляющих РНК (sgRNA или пары crRNA/tracrRNA) показало, что во всех случаях системы CRISPR/Cas9 с парой модифицированных направляющих crRNA/tracrRNA более эффективно расщепляли плазмидную ДНК, чем системы с модифицированными sgRNA.

В результате исследования специфичности расщепления ДНК-мишени, проведенного на модельных ДНК-дуплексах, содержащих однонуклеотидные замены, было выявлено, что системы с 2'-фтор и LNA-модифицированными направляющими crRNA являются более чувствительными к заменам в ДНК, чем их немодифицированные аналоги. Этот результат подтверждает возможность снижения off-target эффектов при использовании модифицированных направляющих РНК.

Были сконструированы и получены 2'-фтормодифицированные направляющие РНК, содержащие один или два фоторасщепляемых линкера с целью создания фоторегулируемой системы CRISPR/Cas9. Продемонстрирована способность инактивации систем CRISPR/Cas9, содержащих направляющие 2'-фтормодифицированные фоторасщепляемые направляющие РНК, путем облучения УФ-светом (365 нм). В результате облучения происходит разрушение фтормодифицированных направляющих РНК, при этом происходит значительное снижение эффективности расщепления модельного ДНК-субстрата.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования модифицированных направляющих РНК для создания эффективных, регулируемых и специфичных систем геномного редактирования CRISPR/Cas9.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00294.

© Л. В. Саковина, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина, 2022

**ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ \***

С. А. Саламайкина<sup>1,2</sup>, К. О. Миронов<sup>1</sup>, В. К. Корчагин<sup>1</sup>, А. С. Есьман<sup>1</sup>, М. А. Карнаушкина<sup>3</sup>, М. М. Литвинова<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

<sup>3</sup>Российский университет дружбы народов, Москва

<sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ

<sup>5</sup>Московский клинический научно-практический центр им. А. С. Логинова

✉ salamaykina@cmd.su

**Аннотация**

Врожденная иммунная система человека является основным механизмом защиты организма-хозяина от воздействия патогенов и состоит из клеточного и гуморального компонентов, распознающих патогены и активирующих внутриклеточные сигнальные каскады.

Наиболее актуальными в контексте изучения иммунного ответа на инфекционные заболевания различной этиологии являются Толл-подобные рецепторы, располагающиеся на поверхности клетки и идентифицирующие различные типы патогенов [1]. Запуск NF-κB сигнального пути толл-подобными рецепторами активирует выработку цитокинов и хемокинов и инициирует воспалительную реакцию.

Наиболее изучено влияние SNP в гене *TLR2* на тяжесть течения туберкулеза [2]. Исследования гена *TLR3* показывают ассоциацию его вариантов с ВИЧ-1 [3]. *TLR4* связан с более тяжелым течением внутрибольничных инфекций, что достоверно показано на большом количестве выборок [4]. *TLR6* играет ключевую роль в распознавании патогенов и активации врожденного иммунитета [5]. *TLR7* идентифицирует РНК вирусов в эндосомах плазматоидных дендритных клеток и В-клеток [6].

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) связаны с изменением первичной структуры белков и влияют на их функцию. Определение SNP, ассоциированных с тяжелым течением инфекций может использоваться при выявлении предрасположенных лиц и для своевременного назначения мероприятий, направленных на снижение рисков развития осложнений. Основная часть исследований о связи SNP в генах TLR с инфекционными заболеваниями, посвящена ассоциациям с туберкулезом.

Цель данного исследования заключается в выборе SNP в генах TLR, являющихся перспективными генетическими маркерами для выявления предрасположенности к тяжелому течению инфекционных заболеваний, и разработке соответствующих методик генотипирования.

Анализ литературы позволил выбрать наиболее часто встречающиеся в исследованиях SNP: rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*), rs3804100 (*TLR2*), rs4986790 (*TLR4*), rs5743810 (*TLR6*), rs3764880 (*TLR8*). Для определения аллелей разработаны основанные на ПЦР в режиме реального времени методики с использованием зондов для гибридизационно-флуоресцентной детекции. Постановку ПЦР проводили на амплификаторах «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия), специфичность определения аллелей подтверждали с использованием системы генетического анализа «PuroMark Q24» (Qiagen, Германия). Апробация разработанных методик проведена на случайной выборке из 99 обезличенных образцов биологического материала (цельной венозной крови), полученного от жителей московского региона.

Выполнено генотипирование выборок больных бактериальными пневмониями и больных новой коронавирусной инфекцией в сравнении с контрольной группой (обезличенных образцов биологического материала цельной венозной крови, полученного от условно здоровых людей).

**Литература**

1. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE, Chou R, Glanville J, Grimshaw JM, Hróbjartsson A, Lalu MM, Li T, Loder EW, Mayo-Wilson E, McDonald S, McGuinness LA, Stewart LA, Thomas J, Tricco AC, Welch VA, Whiting P, Moher D. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *J Clin Epidemiol.* 2021 Jun; 134:178-189. doi: 10.1016/j.jclinepi.2021.03.001. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33789819.

2. Mandala JP, Ahmad S, Pullagurla A, Thada S, Joshi L, Ansari MSS, Valluri VL, Gaddam SL. Toll-like receptor 2 polymorphisms and their effect on the immune response to ESAT-6, Pam3CSK4 TLR2 agonist in pulmonary tuberculosis patients and household contacts. *Cytokine.* 2020 Feb;126:154897. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154897. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31678868.

3. Shi H, He H, Sun C, Fu J, Ghosh D, Deng C, Sheng Y. Association of toll-like receptor polymorphisms with acquisition of HIV infection and clinical findings: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Dec 24;99(52):e23663. doi: 10.1097/MD.00000000000023663. PMID: 33350746; PMCID: PMC7769369.
4. Kumpf O, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koch A, Hamann L, Moukhtaroudi M, Oh DY, Latz E, Lorenz E, Schwartz DA, Ferwerda B, Routsis C, Skalioti C, Kullberg BJ, van der Meer JW, Schlag PM, Netea MG, Zacharowski K, Schumann RR. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care*. 2010;14(3):R103. doi: 10.1186/cc9047. Epub 2010 Jun 3. PMID: 20525286; PMCID: PMC2911747.
5. Mukherjee S, Huda S, Sinha Babu SP. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand J Immunol*. 2019 Jul;90(1):e12771. doi: 10.1111/sji.12771. Epub 2019 May 20. PMID: 31054156.
6. de Marcken M, Dhaliwal K, Danielsen AC, Gautron AS, Dominguez-Villar M. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Sci Signal*. 2019 Oct 29;12(605):eaaw1347. doi: 10.1126/scisignal.aaw1347. PMID: 31662487.

**АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК У МЫШЕЙ С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ ЛЬЮИСА ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ \***Д. В. Салеева<sup>1</sup>, Е. С. Воробьева<sup>1</sup>, Н. Ф. Раева<sup>1</sup>, С. А. Абдуллаев<sup>1,2</sup>, Г. Д. Засухина<sup>1,5</sup><sup>1</sup>Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна  
Федерального медико-биологического агентства России, Москва<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино<sup>3</sup>Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва✉ [dasha\\_saleeva@inbox.ru](mailto:dasha_saleeva@inbox.ru)**Аннотация**

Работа посвящена изучению влияния малых доз радиации на рост трансплантированной карциномы Льюиса у мышей, а также изучение активности генов и некодирующих РНК в тимусе, селезенке, костном мозге и опухоли мышей.

В клетках, подвергающихся воздействию ионизирующего излучения, активируется ряд сложных реакций, включающих повреждение и репарацию ДНК, гибель клеток, изменение уровня пролиферации. В течение многих лет проводилось большое количество исследований активности генов и их регуляторов в клетках млекопитающих в ответ на воздействие высоких доз ионизирующего излучения. Однако до сих пор остается не до конца изученным, как малые дозы радиации (МДР) регулируют активность молекулярно-генетических структур.

Целью нашей работы явилась оценка экспрессии генов и некодирующих РНК (микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК)) в различных органах мышей линии C57Bl/6 с трансплантированными опухолевыми клетками карциномы Льюиса, четырехкратно облученных в малой дозе (0,075 Гр) с интервалом четыре дня.

Объектом исследования являлись 24 мыши-самки линии C57Bl/6, которым подкожно трансплантировали клетки карциномы Льюиса, а затем на 6, 10, 14, 18-е сутки после трансплантации облучали в дозе 0,075 Гр. Эвтаназию мышей путем декапитации осуществляли на 19-е сутки. После облучения в костном мозге, селезенке, тимусе и опухоли определяли экспрессию генов и некодирующих РНК с помощью метода ПЦР-РВ, которые по своим функциональным особенностям были разделены на онкосупрессоры (*P53*, *PTEN*, *P38*, *PINT*, *DINO*, *Incr21*) и онкогены (*NFκB (p50)*, *NFκB (p65)*, *IAP-1*, *IAP-2*, *G-CSF*, *TNFα*, *IkBa*, *iNOS*, *Cyclin E2*, *CTCF*, *TAL1*, *NEAT1*, *MALAT1*, *miR-21*). Результаты представляли в виде медианы изменения экспрессии показателей в группах облученных мышей, выраженных по отношению к медиане группы контроля, принятой за единицу. Для оценки статистической значимости применялся непараметрический критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Результаты. Рост опухоли наблюдали в обеих группах мышей, однако в группе с облучением в малой дозе рост опухоли был в 1,25 раза ниже по сравнению с аналогичной группой без облучения. Профиль изученных генов и некодирующих РНК показал, что в группе «опухоль» отмечается преобладание в активации онкогенов во всех исследуемых органах мышей (64 %, 57 % и 57 %, соответственно в костном мозге, селезенке и тимусе). Иная ситуация отмечается в группе «Опухоль + облучение», где количество инактивированных онкогенов превышало количество активированных в процентном соотношении (71/50 в костном мозге, 64/36 в селезенке, 64/36 в тимусе и 57/36 в опухоли). Кроме того, активировалась экспрессия онкосупрессоров в костном мозге (33 %), тимусе (83 %) и селезенке (67 %). В опухолевой ткани отмечается активация всех исследуемых онкосупрессоров (100 %) при воздействии ионизирующего излучения. Из полученных данных следует, что наиболее чувствительными к действию МДР органами мышей с инокулированной опухолью по активации онкосупрессоров является тимус (83 %), а по ингибированию онкогенов — костный мозг (71 %). Таким образом, если в группе «Опухоль» активировались преимущественно онкогены, то в группе мышей «Опухоль + облучение» преобладало подавление активности онкогенов и активация экспрессии онкосупрессоров в тимусе и опухоли.

Выводы. Нами выявлены изменения активности генов и некодирующих РНК в тимусе, селезенке и костном мозге мышей после четырехкратного облучения в малой дозе. Анализ представленных результатов позволяет сделать вывод о том, что МДР стимулируют иммунную систему мышей, что отражается в преобладании активности онкосупрессоров у облученных в МДР мышей с опухолью и сопровождается менее интенсивным ростом опухоли в этой группе. Полученные результаты показывают роль молекулярно-генетических структур (генов и некодирующих РНК) в реакциях, модулируемых ионизирующим излучением в малых дозах.

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ СИНДРОМА РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА\*

А. Ф. Салихзянова, О. Б. Митрухина, О. В. Яковлева

*Институт фундаментальной медицины и биологии  
Казанского (Приволжского) федерального университета*

✉ salikhzyanovaa@gmail.com

### Аннотация

Изучение связи кишечника — мозг может помочь в разработке новых методов лечения синдрома раздраженного кишечника. В данном исследовании изучается изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера у мышей с моделью хронического синдрома раздраженного кишечника.

Синдром раздраженного кишечника — функциональное желудочно-кишечное расстройство, характеризующееся болью в животе, нарушениями микрофлоры и перистальтики кишечника с частыми сопутствующими психическими нарушениями. Нарушения в микробиоте кишечника способны вызывать ряд неврологических расстройств, однако точные механизмы влияния остаются неизвестны. Одним из путей влияния кишечной микробиоты на мозг может являться синтез короткоцепочных жирных кислот (КЦЖК), осуществляемый бактериями кишечника. КЦЖК, попадая в кровоток, достигают ЦНС и участвуют в моделировании проницаемости гематоэнцефалического барьера. Целью работы являлось выявление изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера при моделировании хронического пост-воспалительного синдрома раздраженного кишечника у мышей.

Животные в возрасте P10 (P — день после рождения) были случайным образом разделены на две группы: контрольную ( $n = 5$ ) и опытную ( $n = 3$ ) с вызванной моделью СРК. Мышам, которые были в контрольной группе, вводили хлорид натрия (NaCl — 0,9 %; 0,5 мл ежедневно для P10-P15 и 1 мл ежедневно для P16-P21). Для создания экспериментальной модели СРК мышам на P10 вводили 1 % раствор уксусной кислоты в течение 10 дней (0,5 мл ежедневно для P10-P15 и 1 мл ежедневно для P16-P21). Для выявления изменений в проницаемости гематоэнцефалического барьера через бедренную вену в кровоток мышам вводился прямой азокраситель Evans Blue в концентрации 2 мл на кг веса. Далее концентрация красителя измерялась в гомогенизированных тканях мозга (гиппокамп и мозжечок) с помощью спектрофотометра микропланшетного формата Thermo Scientific Multiskan FC с длиной волны 620 нм.

У мышей с моделью хронического синдрома раздраженного кишечника концентрация красителя в ткани гиппокампа была в три раза больше, чем в тканях гиппокампа мышей контрольной группы. Концентрация красителя в тканях мозжечка у больных мышей была больше в 2,5 раза по сравнению с результатами мышей контрольной группы.

Из полученных результатов следует вывод об увеличении проницаемости гематоэнцефалического барьера у мышей с моделью хронического синдрома раздраженного кишечника.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 22-25-20045.

© А. Ф. Салихзянова, О. Б. Митрухина, О. В. Яковлева, 2022

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕТЕРОМЕРОВ 5-НТ<sub>7</sub> И TRKB РЕЦЕПТОРОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ И ОЦЕНКА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЗНАЧИМОСТИ\*

С. А. Самарина

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск  
Новосибирский государственный университет*

✉ s.samarina@g.nsu.ru

### Аннотация

В работе рассматривается физическое и функциональное взаимодействие между рецепторами 5-НТ<sub>7</sub> и TrkB в гиппокампе, среднем мозге, фронтальной коре головного мозга мышей. Дальнейшее изучение этого взаимодействия даёт возможность применения новых методов в терапии связанных с этими рецепторами патологических состояний нервной системы.

Седьмой подтип серотонинового рецептора (5-НТ<sub>7</sub>) участвует как в регуляции нормальных физиологических функций, так и в патогенезе некоторых психических расстройств. Тирозинкиназный рецептор В (TrkB) специфично взаимодействует с нейротрофическим фактора мозга (BDNF), опосредуя функции обучения, памяти, дыхания и движения; нарушения BDNF-TrkB-сигналинга ведут к развитию нейродегенеративных заболеваний, аффективных расстройств.

Известно, что 5-НТ<sub>7</sub>-рецептор способен к гетеромеризации как с серотониновыми рецепторами [1], так и с рецепторами других семейств (киназой CDK5 [2], гликопротеином CD44 [3]), функционально взаимодействует с TrkB *in vitro* [4]. Благодаря этим данным в качестве цели работы было выбрано обнаружение гетеромеров 5-НТ<sub>7</sub>-TrkB *in vivo* и общая оценка функциональной значимости этого взаимодействия. При доказательстве в дальнейшем физиологической значимости этого взаимодействия на уровне головного мозга и организма в целом возможно применение этих знаний в фармакологической терапии.

При оценке уровня мРНК исследуемых рецепторов в головном мозге мышей разных возрастов (1-й, 14-й, 30-й, 60-й дни постнатального развития) использовался метод ОТ-ПЦР в реальном времени; наличие олигомерных TrkB-5-НТ<sub>7</sub>-комплексов определяли с помощью метода коиммунопреципитации. Функциональное взаимодействие рецепторов подтверждалось с помощью Вестерн-блот-анализа. Использовались самцы линии C57Bl/6.

Было обнаружено, что соотношение уровней мРНК интересующих нас рецепторов стабилизируется после 30-го дня постнатального развития мыши. На основе полученных данных для дальнейших исследований были взяты мыши 60-го дня постнатального развития. В среднем мозге, гиппокампе, фронтальной коре этих мышей были идентифицированы гетерокомплексы 5-НТ<sub>7</sub>-TrkB-рецепторов. Внутривентрикулярная инъекция агониста 5-НТ<sub>7</sub> рецептора привела к активации (фосфорилированию) TrkB-рецепторов в гиппокампе и среднем мозге мышей; предварительное введение антагониста TrkB-рецептора убрало этот эффект. Таким образом, активация 5-НТ<sub>7</sub> рецепторов в этих структурах сопряжена с активацией TrkB-рецептора. Предположительно именно образование гетерокомплексов способствует такому функциональному взаимодействию. Субхроническая активация 5-НТ<sub>7</sub> сопряжена с депрессивно-подобным поведением, а также с разнонаправленными изменениями нейрональной морфологии, что может быть объяснено, в частности, и образованием олигомерных комплексов с TrkB-рецепторами. Полученные данные помогут предположить новые механизмы процессов, связанных с изменением нейрональной морфологии и развитием аффективных расстройств.

### Литература

1. Renner U., Zeug A., Woehler A. et al. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> differentially regulates receptor signalling and trafficking // J. Cell Sci. 2012. V. 125. № 10. P. 2486–2499.
2. Labus J., Röhrs K.F., Ackmann J. et al. Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT<sub>7</sub> receptor // Prog. Neurobiol. 2021. V. 197. P. 101900.
3. Bijata M., Bącznyńska E., Müller F.E. et al. Activation of the 5-HT<sub>7</sub> receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior // Cell Rep. 2022. V. 38. № 11. P. 110532.
4. Samarajeewa A., Goldemann L., Vasefi M.S. et al. 5-HT<sub>7</sub> receptor activation promotes an increase in TrkB receptor expression and phosphorylation // Front. Behav. Neurosci. 2014. V. 8. P. 391.

\* Исследование проведено в рамках гранта РФФИ №20-04-00253.

## РОЛЬ TRFL БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР У НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ ГРУППЫ BRYOPHYTA \*

А. В. Санникова<sup>1</sup>, М. Р. Шарипова<sup>1</sup>, Е. В. Шакиров<sup>1,2</sup>, Л. Р. Валеева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup>Отделение биологических наук, Научный колледж,  
Университет Маршалла, США, Западная Виргиния, Хантингтон

✉ anastasya.sannikova@bk.ru

### Аннотация

Концевые участки большинства линейных хромосом эукариот защищены нуклеопротеиновыми структурами — теломерами. Белки, входящие в состав теломер и участвующие в поддержании их структуры, являются важными компонентами функционирования теломер. Такие белковые комплексы остаются менее изученными в растениях. В данной работе мы показали естественную вариабельность длины теломер растений из группы Bryophyta и изучили роль растительного теломерного белка TRFL.

Теломерная ДНК большинства эукариот состоит из tandemных повторов, является двуцепочечной на всем протяжении, за исключением непродолжительного одноцепочечного 3'-выступа (G-выступ). Как одно-, так и двуцепочечные участки покрыты различными негистоновыми белками, которые обеспечивают защиту теломерной ДНК и регулируют доступ теломеразы к концу хромосомы. У позвоночных животных двуцепочечную теломерную ДНК связывают TRF-белки (Telomere Repeat Factor). Ранее было показано, что сверхэкспрессия hTRF1 в клетках человека приводит к укорочению длины теломер, тем самым данный белок играет роль негативного регулятора [1]. Функциональные домены TRF позвоночных подробно изучены, однако мало известно о гомологичных белках растений. В растениях были также обнаружены теломерные белки-гомологи — TRFL (TRF-Like). Растительные TRFL-белки так же связывают двуцепочечную теломерную ДНК, но в отличие от позвоночных, растения способны нормально развиваться при повреждении генов данных белков. Бриофиты относятся к одной из самых древних групп ранних наземных растений, что делает их уникальными модельными организмами для молекулярно-генетических и эволюционных исследований растений, в частности, теломер и ассоциированных с ними белков.

Целью работы было изучение различия в длине теломер бриофитов, а также определение роли TRFL-белков в регуляции длины теломер мха *Physcomitrium patens* и *Marchantia polymorpha*. В работе были использованы аксеничные культуры мха *P. patens* четырех экотипов (Gransden, Reute, Villersexel, Kaskaskia), двудомный мох *Ceratodon purpureus* (мужская R40 и женская GG1 линии), природные изоляты сфагнума *Sphagnum fallax* MW (США), *S. girgensohnii* (Россия, Свердловская обл.) и *Sphagnum sp.* (Россия, респ. Марий-Эл), а также печеночник *M. polymorpha*. Для анализа длины теломер использовали геномную ДНК, выделенную из тканей 14-дневной протонемы *P. patens* и *C. purpureus*, гаметофоры сфагнума и таллом маршанции. Анализ длины теломер проводили методом TRF (Terminal Restriction Fragment analysis) совместно с Саузерн-блот анализом. Расчет средней длины теломер проводили с помощью программы TeloTool. Биоинформационный анализ геномов показал наличие двух генов TRFL у *P. patens* и трех генов-гомологов TRFL у *M. polymorpha*. Методом гомологичной рекомбинации были получены два растения *P. patens*, мутантных по гену *PpTRFL2*. Также были получены 20 индивидуальных растений-нокаутов *M. polymorpha* по гену *MpTRFL6* методом CRISPR/Cas9-редактирования генома.

Мы показали, что длина теломер бриофитов имеет как внутривидовую, так и межвидовую вариабельность. Помимо этого, мы установили, что у всех исследованных видов бриофитов и их экотипов присутствуют специфические теломерные последовательности, предположительно внутривидовой локализации, причем отличающиеся своим расположением и длиной.

Нами было показано, что для двух растений-нокаутов *P. patens* по гену TRFL2 присуще небольшое увеличение длины теломер по сравнению с диким типом. Для *M. polymorpha* по гену TRFL1 характерно небольшое уменьшение длины теломер по сравнению с диким типом. Таким образом, мы показали, что растительный теломерный белок TRFL участвует в регуляции длины теломер растений, входящих в группу бриофитов. Однако тогда как TRFL является негативным регулятором длины теломер у *P. patens*, подобно его гомологу у животных и дрожжей, в клетках *M. polymorpha* его роль может отличаться.

### Литература

1. Hanaoka S., Nagadoi A., Nishimura Y. Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities // Protein Sci. 2005. P. 119–30.

\* Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансирована грантом РФФИ № 21-14-00147.

© А. В. Санникова, М. Р. Шарипова, Е. В. Шакиров, Л. Р. Валеева, 2022



**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЗНАЧИМОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПАНЕТА \***М. В. Санькова<sup>1</sup>, В. Н. Николенко<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*<sup>2</sup>*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*✉ [cankov@yandex.ru](mailto:cankov@yandex.ru)**Аннотация**

Клетки Панета играют ключевую роль в поддержании гомеостаза тонкой кишки. Синтезируя многочисленные биологически активные молекулы, эти уникальные эпителиоциты поддерживают здоровую микробиоту кишечника, контролируют своевременную репаративную регенерацию его эпителия, предотвращают развитие инфекционных и онкологических заболеваний. Понимание роли клеток Панета в этих процессах будет способствовать созданию новых методов терапии заболеваний кишечника.

Результаты последних исследований позволили существенно расширить представления об уникальных секреторных механизмах клеток Панета, которые могут способствовать разработке новых методов терапии заболеваний кишечника.

**Целью исследования** явилось всестороннее изучение многообразия синтезируемых клетками Панета биохимических соединений и механизмов их действия для определения уникальной роли этих клеток в организме человека.

**Материал и методы**

Научно-аналитическое исследование содержит анализ современных научных данных электронных баз медицинских статей.

**Результаты**

Благодаря секреции многочисленных биологически активных молекул клетки Панета играют определяющую роль в поддержании гомеостаза тонкой кишки. Важной отличительной особенностью этих энтероцитов является их способность распознавать растворимые микробные продукты с помощью паттерн-распознающих рецепторов и отвечать на эти воздействия выделением целого ряда разнообразных биохимических соединений, которые формируют надёжный биохимический барьер от внедрения вирусов, бактерий и грибов [1, 2]. Так, продуцируемый ими лизоцим разрывает гликозидные связи клеточных стенок бактерий, секреторная фосфолипаза A2 расщепляет их поверхностные фосфолипиды. Антибактериальные лектины RegIII $\beta$  и RegIII $\gamma$  связывают пептидогликаны антигенов и мешают их адгезии, а CRP-дуктин вызывает агглютинацию патогенов. Важная роль в обеспечении антиинфекционной защиты отводится  $\alpha$ -дефензинам, которые образуют сквозные дыры в поверхности мембран-мишеней. Секретируемый клетками Панета ангиогенин-4 модулирует состав кишечной микробиоты и способствует улучшению кровоснабжения кишечного эпителия, а  $\alpha$ 1-антитрипсин обладает выраженными бактерицидными свойствами и, как ингибитор протеаз, защищает энтероциты от протеолитической нагрузки. Конститутивная продукция секреторного IgA повышает специфический местный иммунитет кишечника. Вырабатываемые интерлейкин-17A и провоспалительный фактор некроза опухоли- $\alpha$  контролируют пути дифференцировки иммунных клеток и регулируют выраженность иммунного ответа. Особое значение имеет недавно открытый катепсин G, который участвует в защитно-воспалительных реакциях не только при развитии заболевания, но и в нормальных физиологических условиях [3].

Влияние клеток Панета на стволовые клетки осуществляется, в первую очередь, через постоянно выделяемые ими белки Wnt-лиганды, которые блокируют деградацию бета-катенина, выполняющего роль коактиватора транскрипции трансформирующего фактора роста и транскрипционного фактора (SOX9), и инициируют пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток. Образующиеся при этом мембранные Эфрин-B-рецепторы и лиганды определяют правильное расположение новых энтероцитов вдоль оси крипты — ворсинки. Секретируемые клетками Панета Notch-лиганды запускают деление стволовых клеток, а эпидермальный фактор роста, увеличивая синтез белка и ДНК, приводит к росту энтероцитов. Синтез циклической АДФ-рибозы способствует увеличению количества самих стволовых клеток [3, 4]. Кроме того, клетки Панета, являясь источником большого количества ферментов, участвуют в процессах пищеварения и переваривания патогенов. Наконец, эти энтероциты являются единственными эпителиальными клетками, которые благодаря экспрессии FAS-лиганда способны уничтожать потенциально активированные аутореактивные лимфоциты и аномальные энтероциты [3].

**Заключение**

Клетки Панета являются уникальными эпителиоцитами, которые, синтезируя многочисленные биологически активные молекулы, поддерживают здоровую микробиоту кишечника, контролируют своевременную репаративную регенерацию его эпителия, предотвращают развитие инфекционных и онкологических заболеваний. Понимание роли клеток Панета в этих процессах будет способствовать созданию новых методов терапии заболеваний кишечника.

**Литература**

1. Adolph T.E., Mayr L., Grabherr F., Tilg H. Paneth Cells and their Antimicrobials in Intestinal Immunity // *Curr. Pharm. Des.* 2018. № 24(10). P. 1121–1129. doi: 10.2174/1381612824666180327161947. PMID: 29589539
2. Holly M.K., Smith J.G. Paneth Cells during Viral Infection and Pathogenesis // *Viruses*. 2018. Apr 26. № 10(5). pii: E225. doi: 10.3390/v10050225. Review.
3. Nikolenko V.N., Oganessian M.V., Sankova M.V. et al. Paneth cells: Maintaining dynamic microbiome-host homeostasis, protecting against inflammation and cancer // *Bioessays*. 2021. Mar. № 43(3). P. e2000180. doi: 10.1002/bies.202000180.
4. Gassler N. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology // *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2017. Nov. 15. № 8(4). P. 150–160. doi: 10.4291/wjgp.v8.i4.150. Review. PMID: 29184701

## РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОТИПОВ БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОД *EULIMNOGAMMARUS VITTATUS* В БАЙКАЛЬСКОМ БАССЕЙНЕ\*

А. Е. Сарачина<sup>1</sup>, П. Б. Дроздова<sup>1,2</sup>, М. Д. Дагбаев<sup>1</sup>, Г. Д. Ильин<sup>1</sup>, М. А. Тимофеев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИИ биологии Иркутского государственного университета

<sup>2</sup>АНО «Байкальский исследовательский центр», Иркутск

✉ alexandra147801@gmail.com

### Аннотация

Полученные нами данные позволяют заключить, что байкальские представители *Eulimnogammarus vittatus* делятся как минимум на две гаплогруппы (западная и южная) по маркерному гену 18S рРНК. Ангарские представители данного вида принадлежат к западной кладе.

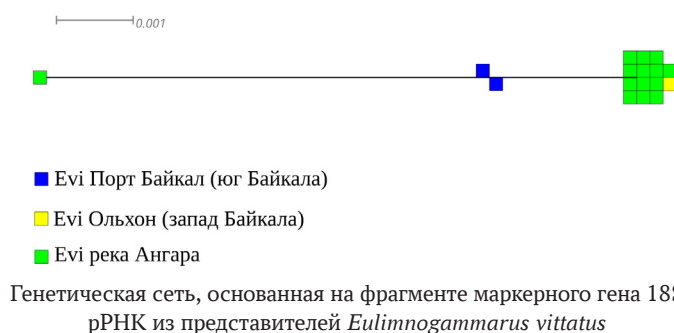
Озеро Байкал — одно из древнейших в мире. Для Байкала, как и для многих древних озёр, характерны группы близкородственных видов. Одна из наиболее разнообразных групп — амфиподы (Crustacea: Amphipoda). Сейчас известно более 350 видов байкальских амфипод; большинство — эндемики озера.

В последнее время разнообразие байкальских амфипод подвергается уточнению с использованием молекулярных методов. Данная работа посвящена изучению литорального вида *Eulimnogammarus vittatus* (Dybowsky, 1874). Ранее изучение маркерного гена первой субъединицы цитохром с-оксидазы показало, что этот вид генетически неоднороден и образует две байкальских филогенетических группы (западную и южную) [1].

Ангара — единственная река, вытекающая из озера Байкал. Возраст Ангары — около 60 тыс. лет [3], в то время как возраст Байкала — 25–35 млн лет. Места обитания обеих гаплогрупп расположены в том числе недалеко от истока Ангары, на южном и западном берегу озера соответственно. Особи данного вида также наблюдаются в Ангаре, однако данных об их принадлежности к конкретной кладе нет.

Примечательно, что в статье Gurkov et al. [1] для родственного вида *E. verrucosus* было установлено разделение на гаплогруппы как по гену COI, так и по более консервативному ядерному маркерному гену 18S рибосомной РНК (рРНК). В данной работе мы хотели установить, разделяются ли байкальские представители *E. vittatus* на западную и южную гаплогруппы по маркерному гену 18S рРНК, и если так, то к какой группе принадлежат ангарские представители. Изучение генетического происхождения вида позволит оценить скорость эволюции в бассейне озера, а также возможные исторические пути миграции амфипод из озера в Ангару.

В ходе работы были отобраны два представителя с южного берега Байкала (Порт Байкал) и 14 животных из реки Ангары в черте города Иркутска. Последовательность гена представителя западной клады *E. vittatus* (Ольхон) была взята из базы данных NCBI. Для амплификации ДНК использовали известные последовательности праймеров [2]. Секвенирование производили по методу Сэнгера с помощью прибора Нанофор-05. В качестве референсной последовательности для объединения прямого и обратного прочтений в программе UGENE использовали последовательность 18S рРНК *E. verrucosus*. Множественное выравнивание производили также в UGENE с помощью алгоритма MUSCLE. Генетическая сеть построена в программе SplitsTree и оформлена в графическом редакторе Inkscape. Согласно полученным данным (см. рисунок), байкальские представители *E. vittatus* разделяются на западную и южную гаплогруппы по маркерному гену 18S рРНК. Большинство животных, пойманных в реке Ангара, принадлежат к западной кладе. Один представитель не принадлежит ни к одной из установленных групп.



### Литература

1. Gurkov A. et al. Indication of ongoing amphipod speciation in Lake Baikal by genetic structures within endemic species // BMC evolutionary biology. 2019. Т. 19. № 138.
2. Macdonald Iii K. S., Yampolsky L., Duffy J.E. Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2005. Т. 35. № 2. С. 323–343.
3. Мац В. Д., Ефимова И. М. Геологическая история Байкала // Природа. 2017. № 3. С. 13–27.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №22-14-00128 и гранта ИГУ №091-22-319.  
© А. Е. Сарачина, П. Б. Дроздова, М. Д. Дагбаев, Г. Д. Ильин, М. А. Тимофеев, 2022

## АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ЕЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СОДЕРЖАНИЯ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ\*

А. М. Сенина, Д. Р. Хуснутдинова, М. И. Маркелова, Е. А. Бульгина, М. Н. Синягина, О. В. Куприянова,  
Л. Ш. Нигматуллина, Г. Э. Сынбулатова, А. Ф. Муллахметова, Т. В. Григорьева

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ Anastasiahm@list.ru

### Аннотация

В работе представлены результаты секвенирования гена 16S рРНК 140 образцов кала от 17 здоровых добровольцев. Охарактеризована стабильность кишечного микробиома на протяжении 16 месяцев с различными интервалами исследования. Проведен корреляционный анализ бактериального сообщества кишечника человека с содержанием КЖК (короткоцепочечных жирных кислот) в кале.

Кишечная микробиота — это сложное сообщество микроорганизмов, которое развивается на протяжении всей жизни, а также имеет сильное влияние на организм хозяина. Неправильное питание, малоактивный образ жизни, зависимость от курения, чрезмерная гигиена, а также использование антибиотиков для борьбы с инфекционными заболеваниями приводят к уменьшению численности комменсальных бактерий в кишечнике человека. Подобное уменьшение считается причиной высокой распространенности метаболических нарушений, включая ожирение, неалкогольную жировую болезнь печени, сахарный диабет 2-го типа и сердечно-сосудистые заболевания [1]. На данный момент модуляция микробиоты лекарственными препаратами имеет недолговременный эффект, что указывает на необходимость более детального изучения ее состава и функциональной стабильности. Кишечные микроорганизмы выполняют множество важных функций, одной из которых является участие в продукции КЖК. Поддержание баланса метаболитов микробиоты кишечника необходимо для поддержания нормального гомеостаза организма хозяина и предотвращения многих заболеваний [2]. В связи с этим целью данного исследования является оценка стабильности кишечной микробиоты в норме путем длительных наблюдений за внутрииндивидуальными изменениями состава микробиоты и содержанием КЖК в кале условно-здоровых добровольцев.

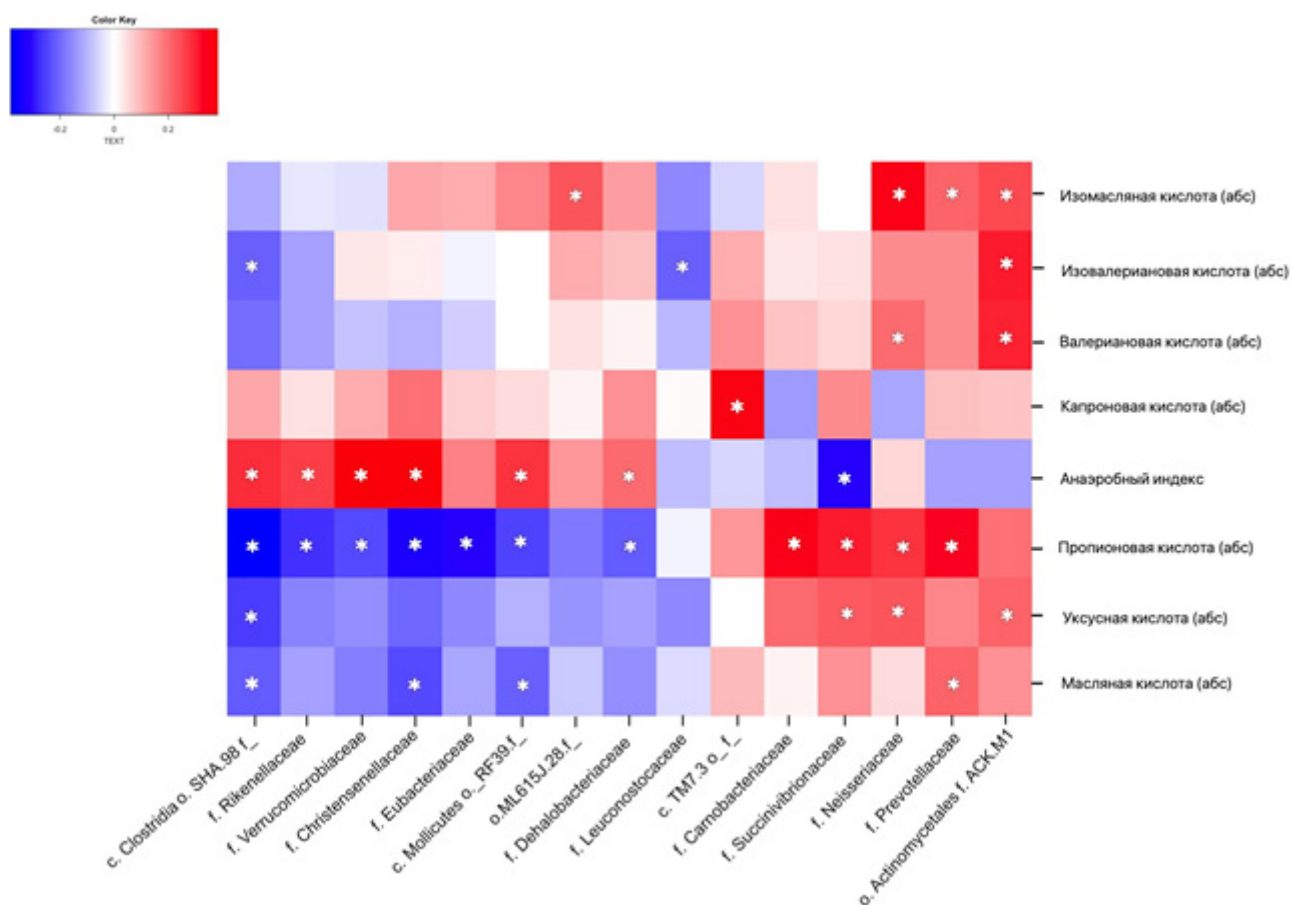
В настоящем исследовании представлены данные 140 образцов от 17 условно-здоровых добровольцев, собранные на 0; 0,5; 2; 4; 6; 8; 10; 12 и 16 месяц исследования. Для анализа микробиоты выделяли ДНК из образцов с использованием набора MP FastDNA Spin Kit for Feces, проводили подготовку метагеномных библиотек и секвенирование V3-V4 региона гена 16S рРНК на платформе Illumina MiSeq. Полученные риды были проанализированы с помощью программы QIIME v.1.9.1 с использованием референсной базы данных GreenGenes 13.8 с 97 %-м порогом сходства между последовательностями. Количество КЖК в кале условно-здоровых добровольцев оценивалось методом газовой хроматографии на приборе Clarus 680 (PerkinElmer).

Для всех образцов был рассчитан критерий Брея–Кертиса, отражающий сходство бактериального состава между ними. В нашей выборке образцы от одного участника эксперимента имели достоверно более низкие значения критерия Брея — Кертиса, чем образцы от разных участников (среднее  $0,28 \pm 0,08$  к  $0,47 \pm 0,1$ ,  $p < 2,2e-16$ ), что свидетельствует о большем сходстве микробиоты от одного участника, чем между участниками. Несмотря на индивидуальные паттерны, доля преобладающих бактериальных таксонов и индекс Шеннона сильно варьировались в течение шестнадцати месяцев. Индекс Шеннона, отражающий разнообразие и равнопредставленность членов бактериального сообщества, в данном исследовании принимал значения от 6,0 до 8,2 (среднее  $7,2 \pm 0,5$ ). Микробиота некоторых участников исследования продемонстрировала более низкое общее разнообразие и больший разброс значений индекса Шеннона во времени.

Между количеством КЖК в кале и составом кишечной микробиоты была обнаружена достоверная положительная корреляция для семейств *Prevotellaceae*, *Actinomycetales ACK.M1*, *Carnobacteriaceae*, *Succinivibrionaceae*, *Neisseriaceae*, отрицательная для семейств *Christensenellaceae*, *Eubacteriaceae* (см. рисунок).

\* Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № 0671-2020-0058).

© А. М. Сенина, Д. Р. Хуснутдинова, М. И. Маркелова, Е. А. Бульгина, М. Н. Синягина, О. В. Куприянова, Л. Ш. Нигматуллина, Г. Э. Сынбулатова, А. Ф. Муллахметова, Т. В. Григорьева, 2022



Корреляции бактериальных семейств кишечника человека и КЖК (\* —  $p < 0,05$ )

### Литература

1. Fan Y., Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease // Nature Reviews Microbiology. 2021. Т. 19. №. 1. С. 55–71.
2. Koh A. et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites // Cell. 2016. Т. 165. № 6. С. 1332–1345.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ АНТИРЕСТРИКЦИОННОГО БЕЛКА ARDB ПРОТИВ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ I ТИПА В ГОМОЛОГИЧНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМАХ\*

К. В. Сикамов, А. А. Кудрявцева, И. В. Манухов

*Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»  
Московский физико-технический институт (государственный университет)*

✉ sikamov.kirill@mail.ru

### Аннотация

Исследование направлено на изучение эффективности работы антирестрикции ArdB *in vivo* против RMI-систем двух семейств — EcoKI (IA) и EcoAI (IB) — в гомологичных экспрессионных системах клеток *Escherichia coli*. Созданы новые штаммы, позволяющие экспрессировать ген *ardB* под контролем рамнозного промотора ( $P_{rhaB}$ ) совместно с генами RMI-систем. Показано, что белок ArdB эффективно ингибирует активность RMI-систем, особенно при высоких концентрациях.

Системы рестрикции-модификации (RM) обеспечивают защиту бактериальных клеток от проникновения чужеродного генетического материала. Однако у плазмид и бактериофагов образовалась способность подавлять рестрикторную активность таких систем, называемая *антирестрикцией*. Так, антирестрикторные белки семейства ArdB специфически ингибируют функции RMI-систем.

В работе [2] было показано, что антирестрикторная активность белков семейства ArdB зависит от их концентрации в клетке. Потому для исследования активности ArdB против RMI-систем — EcoKI и EcoAI, необходимо создать штаммы, содержащие в себе гены соответствующих RMI-систем, а также ген *ardB* под сильным регулируемым промотором.

В качестве такого промотора был выбран рамнозный промотор  $P_{rhaB}$ . Для создания плазмиды, содержащей целевой ген *ardB* (*yfeB*) под контролем этого промотора, был выбран вектор pSOL. Сам ген был выделен из трансмиссивной плазмиды R64 (IncI1), предоставленной коллегами из ВКПМ «ГосНИИгенетика». Клонирование было выполнено в соответствии с методом Гибсона [1]. Исследуемые конструкции (табл. 1) были затрансформированы в клетки TG1 *E.coli* кальциевым методом [3]. Для исследования антирестрикторной активности белка ArdB использовался неметилированный фаг  $\lambda_0$  [4].

Таблица 1

### Описание используемых в исследовании плазмид

Плаزمида	Вектор	Резистентность	Промотор	Кодируемый белок	Источник
pRhamn::ardB	pSOL	Kn	$P_{rhaB}$	ArdB	Эта работа
pAM35	pACYC184	Cm	Конститутивный	EcoAI	Подарок от Г-жи Eva Csefalvai
pAM14	pACYC184	Cm	Конститутивный	EcoAI (Метилтрансфераза)	Подарок от Г-жи Eva Csefalvai
pACYC-EcoKI	pACYC184	Cm	Конститутивный	EcoKI	Исследовательская группа Кудрявцевой А. А.

Таблица 2

### Значения ЕОР посева неметилированного фага $\lambda_0$ на штаммы клеток TG1 с *ardB* геном под контролем $P_{rhaB}$ промотора, а также с RMI системами

Концентрация рамнозы (нг/мл)	0	0,2
TG1	1	1
TG1 pAM35	$4 \times 10^{-2}$	-
TG1 pAM35 pRhamn::ardB	$5 \times 10^{-1}$	$6 \times 10^{-1}$
TG1 pAM14	1,4	-
TG1 pAM14 pRhamn::ardB	-	$8 \times 10^{-1}$
TG1 pACYC-EcoKI	$1 \times 10^{-4}$	-
TG1 pACYC-EcoKI pRhamn::ardB	-	$5 \times 10^{-1}$
TG1 pACYC184	1	-
TG1 pACYC184 pRhamn::ardB	-	1

В табл. 2 видно, что RMI-система EcoKI определяет ухудшение посева фага  $\lambda_0$  на 4 порядка, в то время как EcoAI — на 1,5 порядка. Экспрессирование ArdB под контролем рамнозного промотора приводит к полному антирестрикционному эффекту для EcoKI, а для EcoAI к улучшению посева фага всего на один порядок. При добавлении индуктора эффективность антирестрикции не повышается, хотя результаты гель-электрофореза указывают на высокий уровень экспрессии, исходя из чего можно сделать предположение, что белок подвергается агрегации.

Таким образом, показано, что антирестрикционный белок ArdB эффективно ингибирует работу обеих RMI-систем, особенно при его высоких концентрациях. Различие в эффективности ингибирования может объясняться различным количеством сайтов узнавания на неметилированном фаге  $\lambda_0$ : 5 для EcoKI и всего 1 для EcoAI.

### Литература

1. Gibson Assembly. Goryanin I. I., Kudryavtseva A. A., Balabanov V. P. et al. Antirestriction activities of KlcA (RP4) and ArdB (R64) proteins // FEMS Microbiology Letters. 2018. № 365(23).
2. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Protocol 25 // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. p. 1.116.
3. Zavljelky G. B., Mershavka V. Iu., Iusifov T. N., Belogurov A. A. Weakening of bacteriophage lambda EcoK DNA restriction in the presence of plasmid pKM101 ard+. I. General characteristics and genetic localization // Molekuliarnaia Biologiya. 1984. № 18(6). P. 1590–1596.

## ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС АССОЦИИРОВАН С ФОРМИРОВАНИЕМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА\*

М. Ю. Синицкий, А. В. Синицкая, Д. К. Шишкова, А. В. Понасенко

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово

✉ max-sinitsky@rambler.ru

### Аннотация

Установлено, что генотоксический стресс в эндотелиальных клетках, индуцированный мутагеном алкилирующего механизма действия митомицином С, приводит к дифференциальному воспалительному ответу, который, в свою очередь, является триггером эндотелиальной дисфункции.

Атеросклероз — мультифакторное заболевание, в основе которого лежит комплексный воспалительный процесс. Начальным этапом атерогенеза является эндотелиальная дисфункция, ассоциированная с синтезом различных факторов роста и провоспалительных цитокинов [1]. В настоящий момент известно, что фактором риска развития эндотелиальной дисфункции является в том числе и генотоксический стресс [2].

Цель исследования — оценить экспрессию маркеров воспаления в эндотелиальных клетках, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия митомицином С (ММС).

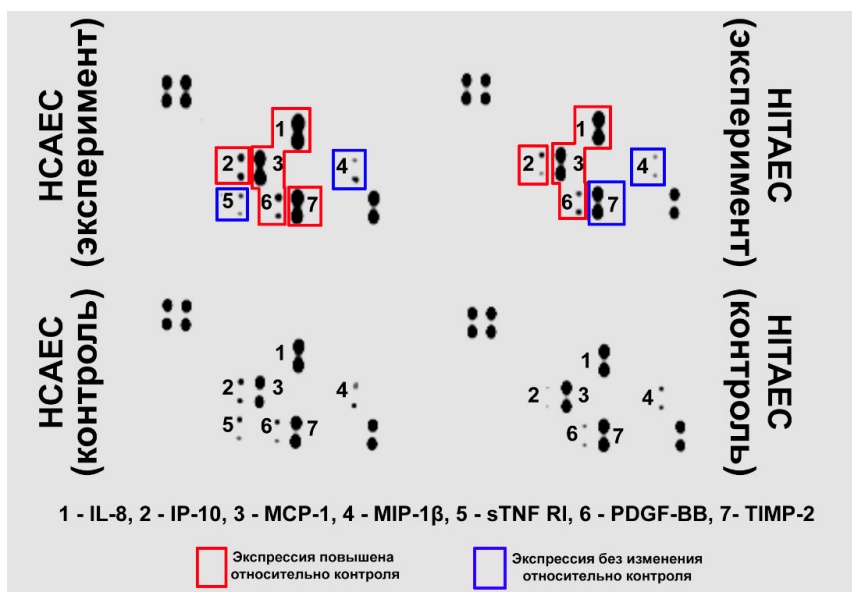
Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС) и внутренней грудной артерий (НТАЕС) человека, культивируемые в присутствии 500 нг/мл ММС (экспериментальная группа) или 0,9 %-го раствора NaCl (контрольная группа).

Цитокиновый профиль клеток оценивали с помощью дот-блоттинга с использованием коммерческого набора Human Inflammation Antibody Array (Abcam, Великобритания) на блот-сканере C-DiGit (LI-COR, США).

Экспрессия генов *IL8*, *MCP-1*, *IP-10*, *MIP-1b*, *TIMP-2*, *TNF-RI* и *PDGFB* оценивалась с помощью ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием праймеров, синтезированных ЗАО «Евроген» (Москва, Россия), на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США). В качестве референсных были использованы гены *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* (ЗАО «Евроген», Москва). Уровень экспрессии генов интереса рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  и выражали как кратность изменения относительно контрольных образцов.

Статистический анализ результатов исследования был проведен в программе GraphPad Prism 9 и ImageJ.

Результаты анализа протеомного профиля изученных клеточных культур представлены на рисунке ниже.



Результаты протеомного профилирования эндотелиальных клеток (НСАЕС — эндотелиальные клетки коронарной артерии, НТАЕС — эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии)

\* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук МК-1228.2021.1.4.



В обеих изученных клеточных линиях, экспонированных ММС, отмечено увеличение секреции белков IL-8, MCP-1, IP-10 и PDGFB, а также отсутствие различий в продукции MIP-1b относительно контроля. Белок TIMP-2 синтезировался активнее в экспонированных ММС клетках HCAEC, но не в клетках HITAEC. Белок sTNF RI был отмечен только в клетках HCAEC, в которых он экспрессировался на одинаковом уровне и в контроле, и в эксперименте. Для валидации полученных результатов протеомного профилирования был проведен анализ генной экспрессии соответствующих генов. Установлено, что клетки HCAEC, экспонированные ММС, характеризуются повышенной экспрессией генов *IL-8*, *MCP-1* и *IP-10*, сниженной экспрессией гена *TIMP-2* и отсутствием изменений уровня мРНК генов *MIP-1b* и *PDGFB* в сравнении с контролем. В экспериментальных клетках HITAEC отмечен повышенный уровень мРНК генов *IL-8* и *IP-10*, пониженная экспрессия гена *TIMP-2*, также отсутствие изменений в экспрессии генов *MCP-1*, *MIP-1b* и *PDGFB*. Ген *TNF-RI* не экспрессировался ни в одной из изученных групп (см. таблицу).

**Кратность изменения генной экспрессии  
в экспонированных митомицином С эндотелиальных клетках относительно контроля**

	<b>HCAEC</b>	<b>HITAEC</b>
<i>IL-8</i>	10,9*	2,7*
<i>MCP-1</i>	2,2*	1,1
<i>IP-10</i>	5,7*	3,6*
<i>MIP-1b</i>	0,9	0,8
<i>PDGFB</i>	1,2	1,1
<i>TIMP-2</i>	0,6*	0,6*
<i>TNF-RI</i>	–	–

Примечание: \* — значимые отличия от контрольной группы

В результате проведенного исследования установлено, что первичные эндотелиальные клетки различных артерий человека характеризуются дифференциальной чувствительностью к ММС-индуцированному генотоксическому стрессу, что проявляется в различном характере экспрессии маркеров воспалительного ответа.

**Литература**

1. Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis // Nature. 2011. V. 473. № 7347. P. 317–325.
2. Сеницкий М.Ю., Цепочкина А.В., Кутихин А.Г. и др. Профиль генной экспрессии в эндотелиальных клетках, культивируемых в присутствии митомицина С // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67. № 2. С. 130–136.

## ЭФФЕКТ НОКАУТА ГЕНА *TNF* НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА ПРИ ВВЕДЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА\*

А. К. Скотникова<sup>1</sup>, Е. А. Куликова<sup>2</sup>, В. С. Москалюк<sup>2</sup>, А. В. Куликов<sup>2</sup>, Д. В. Базовкина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

✉ a.skotnikova@g.nsu.ru

### Аннотация

У мышей с нокаутом гена, кодирующего фактор некроза опухоли (*tumor necrosis factor*, *TNF*) введение бактериального липополисахарида (ЛПС) замедлило обучение в тесте «Водный лабиринт Морриса», чего не было показано для животных дикого типа. В то же время введение ЛПС привело к статистически значимому росту соотношения proBDNF/BDNF в префронтальной коре и гиппокампе у животных дикого типа, но не у животных с нокаутом гена *Tnf*.

Провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли (*TNF*) — один из ключевых посредников между иммунной и центральной нервной системой. В норме *TNF* экспрессируется в очень малых количествах, но при введении бактериального липополисахарида (ЛПС), компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий, экспрессия *TNF* и других провоспалительных цитокинов значительно возрастает в ЦНС и на периферии [1]. Длительное введение ЛПС приводит к активации микроглии и нейровоспалению, апоптотическим процессам, изменению содержания нейротрофических факторов, а также к нарушению когнитивных функций [2].

Целью работы было исследование эффекта полного нокаута гена, кодирующего *TNF*, на регуляцию поведения и экспрессию нейротрофического фактора мозга BDNF и его TrkB и p75 рецепторов у мышей при продолжительном введении ЛПС. Эксперименты проводили на половозрелых самцах мышей с нокаутом гена *Tnf* (*TNF KO*, *Tnf*<sup>-/-</sup>) ( $n = 21$ ) и самцах мышей инбредной линии C57BL/6 (WT, дикый тип) ( $n = 21$ ). Линия *TNF KO* была получена в лаборатории Генетики развития ФИЦ ИЦиГ СО РАН методом редактирования генома системой CRISPR/Cas9. Данная линия содержит делецию 241 п.о., которая приводит к удалению первых 25 п.о. первого экзона и удаляет 5'UTR гена *Tnf* (промоторная область). В качестве контроля для данной нокаутной линии использовали животных родительской инбредной линии C57BL/6, поскольку она послужила генетической основой для нокаутных животных. ЛПС вводили внутривентриально в дозе 250 мкг/кг веса животного ежедневно в течение пяти дней. Контрольные животные обеих линий получали инъекции стерильного физиологического раствора. Поведение оценивали в тестах «Открытое поле» и «Водный лабиринт Морриса». Уровни мРНК генов в структурах мозга (фронтальная кора, гиппокамп) оценивали методом ОТ-ПЦР реального времени. Содержание белков в структурах мозга исследовали методом вестерн-блот-анализа. Анализ данных проводили двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA и двухфакторным анализом ANOVA с повторными измерениями (результаты по тесту «Водный лабиринт Морриса»). Для анализа межгрупповых сравнений использовали тест Фишера.

Введение ЛПС не повлияло на двигательную и исследовательскую активности у мышей обеих линий в тесте «Открытое поле». Однако ЛПС замедлил обучение в тесте «Водный лабиринт Морриса» у мышей с нокаутом *TNF*, но не повлиял на этот показатель у самцов дикого типа. ЛПС не оказал эффекта на экспрессию генов, кодирующих BDNF и его TrkB и p75 рецепторы, в исследованных структурах мозга. При этом было показано, что под воздействием длительного введения бактериального липополисахарида происходит повышение уровня белка proBDNF (предшественника BDNF) ( $p < 0,05$ ) в префронтальной коре и гиппокампе, однако этот эффект более выражен у животных дикого типа, что отразилось на величине соотношения proBDNF/BDNF. Статистически значимый рост соотношения proBDNF/BDNF ( $p < 0,05$ ) в префронтальной коре и гиппокампе под воздействием ЛПС был выявлен только у животных дикого типа, что может свидетельствовать об обусловленной введением ЛПС синаптической дисфункции у этих мышей. При этом продолжительное введение ЛПС не повлияло на содержание белков TrkB и p75 рецепторов в структурах мозга мышей обеих линий.

Полученные данные позволяют расширить представление о влиянии цитокина *TNF* на регуляцию поведения и нейротрофического обеспечения мозга.

### Литература

1. Hoogland I. et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments // Journal of Neuroinflammation. 2015. № 12.
2. Mu R. et al. 1-Methylnicotinamide attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive deficits via targeting neuroinflammation and neuronal apoptosis // International Immunopharmacology. 2019. № 77.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 21-15-00051.

## АНАЛИЗ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ МОЛЕКУЛ DAMP'S ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКИ-ИНДУЦИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ГЛИОМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕТРААРИЛТЕТРААНОПОРФИРАЗИНОВ\*

Е. Е. Слепцова<sup>1</sup>, В. Д. Турубанова<sup>1,2</sup>, Т. С. Редькин<sup>1</sup>, М. О. Савюк<sup>1</sup>, М. В. Ведунова<sup>1</sup>, Д. В. Крысько<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

<sup>2</sup>Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT),  
кафедра анатомии и регенерации человека, Гентский университет, Бельгия

<sup>3</sup>Институт исследований рака, Гент, Бельгия

### Аннотация

Традиционные методы лечения глиомы приводят к ограниченному улучшению прогноза. В этой ситуации иммунотерапия стала многообещающей стратегией. Один из вариантов иммунотерапии — это индукция иммуногенной клеточной гибели, характеризующейся повышенным иммуногенным потенциалом из-за высвобождения молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP's) в ответ на гибель клеток и стресс.

Уровень иммуногенности умирающих раковых клеток определяет эффективность противоопухолевой терапии. Фотодинамическая терапия может индуцировать иммуногенную гибель клеток. Выделение DAMP's может вызвать эффективный противоопухолевый иммунитет, причем уровень экспонирования каждой отдельной молекулы важен для всей иммуногенности в целом.

Целью данного исследования было проанализировать уровень высвобождения двух молекул DAMP's, АТФ и HMGB1, при клеточной гибели, опосредованной фотодинамическим воздействием (ФДТ) на основе тетраарилтетраанопорфиразинов (pz I, pz II, pz III, pz IV).

Гибель клеток индуцировали фотодинамическим воздействием. Для этого клетки глиомы GL261 инкубировали с фотосенсибилизатором, после чего облучали дозой 20 Дж/см<sup>2</sup> с использованием светодиодного источника света ( $\lambda_{ex}$  615-635 нм). Далее клетки культивировали соответствующее для группы количество часов.

Была произведена оценка жизнеспособности, позволившая показать, что с увеличением времени инкубации после ФДТ увеличивается количество мертвых клеток в культуре. Таким образом, было продемонстрировано, что клетки умирают не напрямую от ФДТ, но и от распознавания молекулярных сигналов, испускаемых другими клетками (рис. 1).

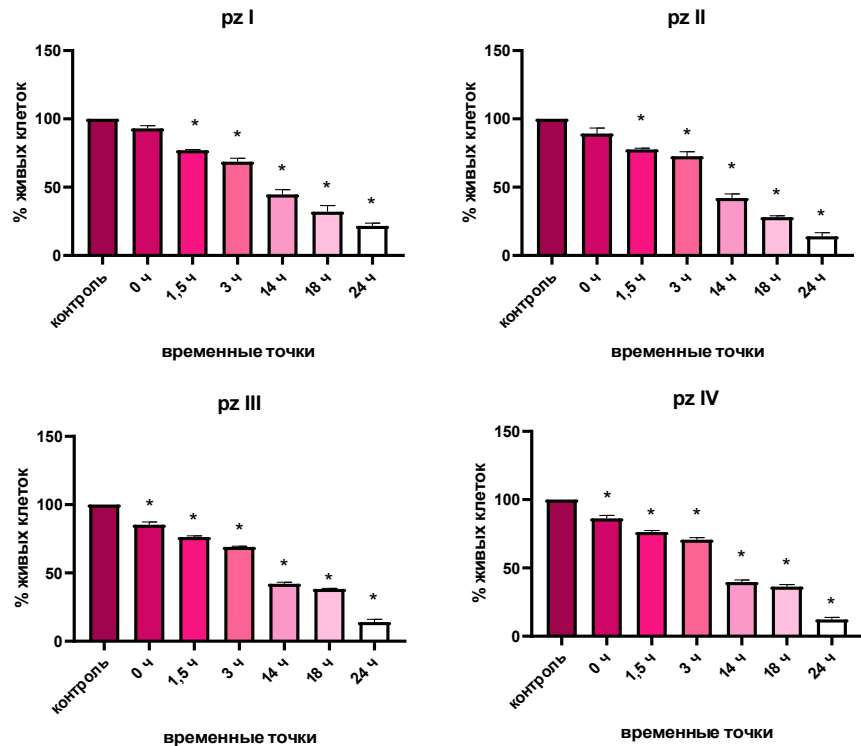


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеток глиомы GL261, подвергшимся ФДТ с применением порфиразинов. Оценка проводилась методом МТТ-анализа. \* — статистически значимое отличие указанных вариантов относительно контроля, *t*-критерий Уэлча,  $p < 0,05$

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-15-00279, <https://rscf.ru/project/18-15-00279/>  
© Е. Е. Слепцова, В. Д. Турубанова, Т. С. Редькин, М. О. Савюк, М. В. Ведунова, Д. В. Крысько, 2022

В анализе высвобождения АТФ не было выявлено универсального значения времени максимальной концентрации молекулы во внеклеточной среде, однако было показано, что для каждого порфиразина существует свой пик выброса этого DAMP из клетки. Причем клетки, подвергшиеся фотоиндукции на основе рз I и рз II, показывают более позднее повышение концентрации АТФ во внеклеточной среде, в отличие от клеток, подвергшихся ФДТ на основе рз III и рз IV (рис. 2).

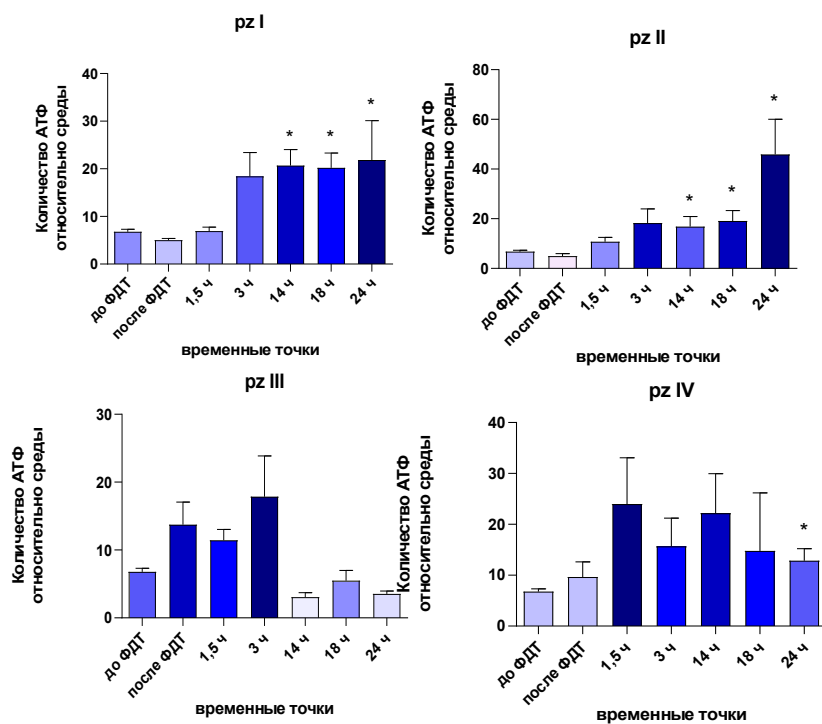


Рис. 2. Испускание АТФ умирающими клетками глиомы GL261, подвергшимся ФДТ с применением рз I, рз II, рз III и рз IV. Значения представлены кратным увеличением АТФ по сравнению с культуральной средой. \* — статистически значимое отличие указанных вариантов относительно контроля, t-критерий Уэлча,  $p < 0,05$

В отношении высвобождения HMGB1 был продемонстрирован схожий профиль уровня выделения данной молекулы с секрецией АТФ (рис. 3).

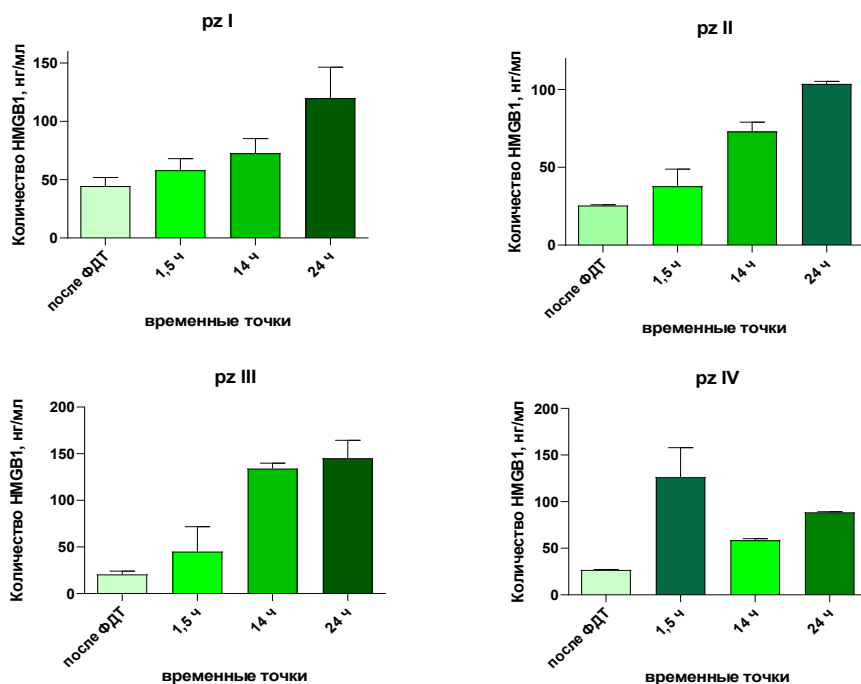


Рис. 3. Испускание HMGB1 умирающими клетками глиомы GL261, подвергшимся ФДТ с применением рз I, рз II, рз III и рз IV

**Выводы**

Вследствие фотодинамической индукции клеток глиомы с применением четырех исследуемых порфиринов происходит испускание DAMP's, что может говорить об иммуногенном потенциале клеточной гибели. Уровень испускания DAMP's не связан с процентом клеточной гибели после фотоиндукции. При стабильном уменьшении уровня жизнеспособности концентрации АТФ и HMGB1 во внеклеточной среде меняются.

**ФЕРМЕНТЫ КЛАНА CYP74 ЛАНЦЕТНИКОВ:  
BRANCHIOSTOMA FLORIDAE, B. BELCHERII И B. LANCEOLATUM\***

Е. О. Смирнова, С. С. Горина, Н. В. Ланцова, Я. Ю. Топоркова, А. Н. Гречкин

*Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН»*

✉ yelena.smirnova@aiesec.net

**Аннотация**

В настоящей работе описаны и охарактеризованы три фермента клана CYP74 трех видов ланцетников *Branchiostoma floridae*, *B. belcherii* и обитающего в Черном море *B. lanceolatum*. Кроме того, охарактеризованы продукты каталитического действия данных ферментов.

Оксилипины являются важными липидными медиаторами, которые образуются из полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). В биосинтезе оксилипинов принимают участие такие ферменты как циклооксигеназы, липоксигеназы и цитохромы P450. Кроме того, оксилипины могут образовываться спонтанно без участия ферментов (фитопростаны).

Оксилипины животных включают эйкозаноиды и октадеканойды. У млекопитающих эйкозаноиды изучены очень хорошо. Они принимают участие в регуляции основных физиологических функций. В то же время механизмы образования, а также свойства октадеканойдов животных остаются практически неизученными, несмотря на то что содержание C18-жирных кислот в животных тканях достигает значительного количества. При этом оксилипины октадеканового ряда, образуемые в рамках липоксигеназного каскада, хорошо изучены у растений. Показано, что они являются продуктами каталитического действия липоксигеназ и цитохромов P450 семейства CYP74, к которым относятся алленоксидсинтазы (АОС), дивинилэфирсинтазы (ДЭС), гидропероксидлиазы (ГПЛ).

Ферменты семейства CYP74 ранее были обнаружены только у растений. Однако не так давно были обнаружены ферменты, обладающие сходными с представителями семейства CYP74 последовательностями, структурами и механизмами каталитического действия. Подобные ферменты были описаны у животных, протеобактерий, бурых и зеленых водорослей. По требованиям номенклатуры цитохромов P450 они относятся к другим семействам. В связи с этим было введено понятие клана CYP74. К нему отнесли еще одну группу ферментов — эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). В 2008 году был охарактеризован первый представитель этого класса ферментов — ЭАС ланцетника. В дальнейшем ЭАС были обнаружены нами у бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и актинии *Nematostella vectensis*. Кроме того, ЭАС-активность была обнаружена у ГПЛ подсемейства CYP74C и некоторых ферментов из подсемейства CYP74B. В 2018 г. была охарактеризована и описана первая растительная эпоксиалкогольсинтаза, относящаяся к семейству CYP74, — фермент плаунка *Selaginella moellendorffii*.

В настоящей работе описаны и охарактеризованы три фермента трех видов ланцетников *Branchiostoma floridae*, *B. belcherii* и обитающего в Черном море *B. lanceolatum*. Фермент *B. floridae* превращает гидроперекиси жирных кислот исключительно в оксиранил карбинолы (эпоксиспирты), что указывает на то, что данный фермент обладает исключительно ЭАС-активностью. Это уже второй фермент подобного типа, описанный для данного вида животных. Ему было присвоено тривиальное название BfEAS2. В то же время фермент ланцетника *B. belcherii* проявляет двойную активность алленоксидсинтазы и эпоксиалкогольсинтазы. Ему присвоено тривиальное название BbEAS/AOS. Это первый фермент клана CYP74 животных, обладающий АОС-активностью.

Фермент *B. lanceolatum* является самым необычным ферментом из всех перечисленных. При участии данного фермента могут образовываться дивиниловые эфиры (ДЭС-продукты), эпоксиспирты (ЭАС-продукты) и лейкоториенподобные соединения. Последние соединения не являются типичными продуктами реакций, катализируемых ферментами CYP74.

Важно отметить, что продукты ЭАС реакции представителей разных таксонов различаются по стереохимии. ЭАС животных продуцируют эпоксиспирты с *цис*-дизамещенным эпоксидом. А эпоксиспирты, синтезированные при участии растительных ЭАС, содержат *транс*-дизамещенное эпоксидное кольцо. По-видимому, образование эпоксиспиртов с *цис*-конфигурацией эпоксидного кольца является особенностью ЭАС животных. Полученные результаты вносят в существенный вклад в понимание развития и становления липоксигеназного каскада у животных.

\* Рекомбинантные ферменты были получены при финансовой поддержке государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН. Каталитическая активность рекомбинантных ферментов была изучена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-14-00338.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ МИКРОБИОТЫ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА\*

Д. М. Сорокина, Д. Р. Яруллина, О. В. Яковлева

Казанский (Приволжский) федеральный университет

✉ dinagabita@mail.ru

Одним из наиболее распространенных функциональных желудочно-кишечных расстройств является синдром раздраженного кишечника (СРК), в широком смысле определяемый как варибельное сочетание хронических желудочно-кишечных симптомов, таких как боль и дискомфорт в животе, а также изменение формы и частоты стула, которые не объясняются структурными или биохимическими аномалиями [2]. Несмотря на высокую распространенность, этиология и патофизиология СРК остаются малоизученными и часто относят к многофакторным заболеваниям [1]. Целью работы было оценить роль микробиоты в развитии хронической модели пост-воспалительного СРК.

Модель пост-воспалительного СРК — это экспериментальная модель неонатальной сенсibilизации у мышей, вызванная интравектальным введением 1 % раствора уксусной кислоты [3], который вызывает висцеральную гиперчувствительность у взрослых животных без признаков гистологического воспаления [4]. В работе использовали самцов белых мышей. Всех новорожденных, использованных в экспериментах, содержали в клетке вместе с одной взрослой самкой мыши до достижения ими месячного возраста. Животные в возрасте P10 (P — день после рождения) были случайным образом разделены на две группы: контрольную ( $n = 24$ ) и опытную ( $n = 25$ ) с вызванной моделью СРК. Мышам, которые были в контрольной группе, вводили хлорид натрия (NaCl — 0,9 %-й; 0,5 мл ежедневно для P10-P15 и 1 мл ежедневно для P16-P21). Для создания экспериментальной модели СРК мышам на P10 вводили раствор уксусной кислоты в течение 10 дней (0,5 мл ежедневно для P10-P15 и 1 мл ежедневно для P16-P21). Массу тела мышей во всех группах измеряли в одно и то же время в возрасте P11 и P21, P26 и P40. Оценка состава кишечной микробиоты проводилась методами классической микробиологии.

В опытной группе смертность составила 8 %, в то время как в группе контроля выживаемость была 100 %. В опытной группе наблюдали отставание набора массы тела по сравнению с контрольной группой. Так, за 10 дней создания модели в контрольной группе наблюдался прирост в 62 %. В опытной группе прирост составил лишь 49 %, что достоверно меньше контроля ( $p < 0,05$ ). Дальнейшие наблюдения за изменением массы тела мышей показали сохранение данной тенденции.

Исследование состава кишечной микрофлоры при пост-воспалительном СРК не показало изменений в общей обсемененности образцов, но выявило снижение содержания молочнокислых бактерий, лактозоположительных энтеробактерий и увеличение количества лактозоотрицательных *Salmonella* spp. и *Shigella* spp., что свидетельствует о неблагоприятных изменениях в кишечной микробиоте при СРК.

По-видимому, морфометрические изменения у мышей с хронической моделью пост-воспалительной СРК связаны с изменением состава микробиоты кишечника.

### Литература

1. Farzaei et al. The role of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: pharmacological targets and novel treatments / Farzaei M. H., Bahramsoltani R., Abdollahi M, Rahimi R. // J. Neurogastroenterol. Motil. 2016. P. 558.
2. Ford et al. Effect of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: an updated systematic review and meta-analysis / Ford A. C., Lacy B. E., Harris L. A., Quigley E. M., Moayyedi P. // Am. J. Gastroenterol. 2019. P. 21–39.
3. Temiz et al. Effect of nitrenergic system on colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome / T. K. Temiz, O. Demir, F. Simsek, Y. C. Kaplan, S. Bahceci, B. Karadas, A. Celik, G. Koyluoglu // Indian Journal of Pharmacology. 2016. Vol. 48. № 4. P. 424–429.
4. Yang et al. Changes of cytokine levels in a mouse model of post-infectious irritable bowel syndrome / B. Yang, X. Zhou, C. Lan // BMC Gastroenterology. 2015. Vol. 15. № 1. P. 1–7.

\* Работа поддержана грантом РФФ № 22-25-20045.

## ВЫЯВЛЕНИЕ РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЛПС В МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ\*

К. А. Столбунова<sup>1</sup>, О. В. Охлопкова<sup>1</sup>, Э. Кабве<sup>2</sup>, Ю. Н. Давидюк<sup>2</sup>,  
М. А. Степанюк<sup>1</sup>, Ю. А. Юрченко<sup>3</sup>, С. Ф. Хайбуллина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>3</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области

✉ stolbunova\_ka@vector.nsc.ru

### Аннотация

В рамках работ по данному направлению установлено наличие ортохантавирусной РНК в ряде исследуемых проб, отобранных от мелких млекопитающих на территории Новосибирской области.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — это особо опасная природно-очаговая зоонозная инфекция, вызываемая вирусами семейства *Hantaviridae* рода *Orthohantavirus*. Ортохантавирусы характеризуются высокой изменчивостью генома, что может являться причиной появления новых патогенных для человека генетических вариантов вируса как на эндемичных, так и на неэндемичных территориях. Часто течение болезни у человека сопровождается риском появления осложнений, высокой степени интоксикации, выраженности геморрагического синдрома, степени нарушения почечной функции. Смертность составляет 0,3–15 % в зависимости от вида возбудителя. Основным природным резервуаром возбудителей инфекции являются мелкие млекопитающие. Наибольшему риску заражения ГЛПС подвержены люди, проживающие в сельской местности, контактирующие с мелкими млекопитающими и продуктами их жизнедеятельности.

**Цель работы:** выявление районов циркуляции возбудителей ГЛПС на территории Новосибирской области.

Для достижения цели за время полевого сезона 2021 г. было отловлено 139 особей мелких млекопитающих, относящихся к восьми видам грызунов и насекомоядных из шести районов Новосибирской области. Отлов млекопитающих происходил в различных биотопах: околородном, лугополевым и лесостепным. Все этапы исследования проводили посредством использования стандартных молекулярно-биологических методик. Первичный скрининг возбудителей проводили методом ПЦР в реальном времени. Для нескольких образцов методом вложенной ПЦР (nested-PCR) были получены ампликоны, которые далее секвенировали по методу Сэнгера.

Значения идентичности нуклеотидных последовательностей секвенированных ПЦР-продуктов длиной 154 пар нуклеотидов с последовательностями генома ортохантавируса *Puumala* (PUUV) превышали 90 %, что указывает на распространённость PUUV-подобных вирусов в исследованных популяциях мелких млекопитающих и возможность выявления очагов ГЛПС на исследованных территориях.

Ортохантавирусная РНК была выявлена у 31 особи мелких млекопитающих из 139 отловленных, в частности, у таких как бурозубка обыкновенная (*Sorex araneus*), мышь-малютка (*Micromys minutus*), полевая мышь (*Apodemus agrarius*), полевка красная (*Myodes rutilus*), полевка-экономка (*Microtus oeconomus*), узкочерепная полевка (*Microtus gregalis*) на территории Новосибирской области в Карасукском, Чулымском, Краснозерском, Здвинском, Барабинском районах. У мелких млекопитающих, отловленных в Маслянинском районе, ортохантавирусная РНК обнаружена не была. В целом на территории Новосибирской области в 2021 г. наиболее высокий процент особей с ортохантавирусной РНК был выявлен у красной полевки. Наибольшее количество положительных результатов было получено при исследовании околородного биотопа, наименьшее — лугополевого. На околородной территории ортохантавирусная РНК преимущественно выявлена у полевки-экономки; на лугополевой территории — у узкочерепной полевки; в лесостепном биотопе — у красной полевки.

В ходе дальнейшей работы будут проанализированы последовательности выявленных PUUV-подобных РНК, в том числе с помощью метода NGS. Важной задачей будет также выявление факторов на территории Новосибирской области, способствующих увеличению генетического разнообразия РНК-вирусов, появлению их новых генетических вариантов и видов.



**МАРКЕР ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 И ЦИТОКИНЫ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ \***А. А. Студеникина<sup>1,2</sup>, Е. С. Михайлова<sup>1,2</sup>, Н. А. Вараксин<sup>3</sup>, С. А. Архипов<sup>1,2</sup>, А. И. Аутеншлюс<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Новосибирский государственный медицинский университет<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск<sup>3</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

\*✉ st.aa73@gmail.com

**Аннотация**

Были изучены концентрации цитокинов и экспрессия Ki-67 в образцах опухолей опухоли у пациентов с раком молочной железы (РМЖ) при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования. Для пациентов с лимфогенным метастазированием характерна более высокая экспрессия Ki-67 и повышенные концентрации IL-2 и IL-18, по сравнению с пациентами без лимфогенного метастазирования.

Для рака молочной железы (РМЖ) характерно лимфогенное метастазирование. Высокая пролиферативная активность неоплазмы способствует гетерогенности популяции опухолевых клеток и возникновению более агрессивного, инвазивного фенотипа. Самым известным маркером пролиферации является Ki-67. Кроме того, опухоли приобретают способность к миграции и метастазированию в ходе эпителиально-мезенхимального перехода, индукторами которого выступают цитокины.

Цель работы: изучение концентрации цитокинов и экспрессии Ki-67 в образцах опухолей у пациентов с РМЖ при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования.

Материалом исследования служили образцы опухолей молочной железы 61 пациента РМЖ, с гистологическим типом — инвазивная карцинома неспецифического типа G1 и G2 стадий. Средний возраст больных составил 54 года (от 23 до 74 лет), у 26 из них обнаруживались метастазы в регионарных лимфатических узлах, у остальных 37 пациентов метастазы отсутствовали. Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования. В супернатанте образцов опухолей пациентов с РМЖ с помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию цитокинов: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 с использованием наборов реагентов «Вектор-Бест» (Россия). Иммуногистохимическое исследование экспрессии Ki-67 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием моноклональных антител (Leica Biosystems Inc.) и системы визуализации VECTASTAIN ABC Kit («Vector Laboratories», США). Для статистической обработки результатов использовали SPSS v 22.0 for Windows.

По результатам исследования экспрессия Ki-67 ( $p = 0,0001$ ) и концентрации IL-2 и IL-18 ( $p = 0,019$ ;  $p = 0,018$ ) были выявлены статистически значимые различия выше у пациентов с лимфогенным метастазированием по сравнению с пациентами без лимфогенного метастазирования. Несмотря на это, при проведении корреляционного анализа, не было обнаружено взаимосвязей между уровнем экспрессии Ki-67 и концентрациями цитокинов.

**Вывод**

Цитокины изменяются при многих патологических состояниях, в том числе и при онкологических заболеваниях. В нашем исследовании при G1 и G2 РМЖ по показателям концентраций IL-2 и IL-18 в супернатанте образцов опухолей можно судить о наличии лимфогенного метастазирования, кроме того, маркер пролиферации Ki-67 также позволяет сделать аналогичное заключение. Отсутствие взаимосвязи между цитокинами и Ki-67 говорит о разноплановых процессах, происходящих в опухолевых клетках, наделяющих их способностью к миграции в регионарные лимфатические узлы.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОРТРЕТ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ *IN VIVO*\*

М. С. Третьякова, У. А. Бокова, А. А. Фролова, В. В. Алифанов,  
Е. С. Андрюхова, Е. Е. Иванюк, Н. В. Чердынцева, В. М. Перельмутер, Е. В. Денисов

НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

✉ [ttremar@mail.ru](mailto:ttremar@mail.ru)

### Аннотация

Трансплантация мышам первичной опухоли молочной железы показала наиболее эффективные результаты получения ксенографтов, и их последующее удаление провоцировало появление метастазов. Очевидное превосходство некоторых популяций опухолевых клеток выявлено при гематогенном метастазировании. Суммарное количество CD45<sup>+</sup>ErCam<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>N<sup>-</sup>cadh<sup>+</sup> клеток увеличилось в метастазе по сравнению с первичной опухолью в 14 раз, что подтверждает их значимость в метастазировании.

### Введение

PDX (patient-derived xenograft)-модели являются эффективным инструментом для изучения поведения клеток первичной опухоли при трансплантации *in vivo*. В этом отношении поиск опухолевых клеток, ответственных за метастазирование, и выяснение их молекулярного портрета являются одними из ключевых задач современной онкологии.

**Цель исследования** — определить молекулярный портрет опухолевых клеток, играющих ключевую роль в метастазировании рака молочной железы (РМЖ).

### Материалы и методы

Самкам мышей Balb/c nude (8 нед.) проводили трансплантацию клеток двумя способами. Одной группе подкожно в область спины вводилась суспензия первичных опухолевых клеток, полученных из операционного материала РМЖ, со средой DMEM и с матригелем в объеме 100 мкл. Второй группе мышей в область молочной железы подшивали свежий хирургический материал первичной опухоли объемом от 0,3 см<sup>3</sup> и более, после вставания в брюшную стенку его резецировали. Антитела к CD45, ErCam, CK7/8, CD44, CD24, N-cadherin использовали для фенотипирования методом проточной цитометрии (NovoCyte 3000 ACEA Biosciences, Agilent, США).

### Результаты

Микрометастазы в регионарных лимфатических узлах были обнаружены только при инъекции опухолевых клеток спустя 2–4 недели у 5/10 мышей. Солидный гематогенный метастаз был зафиксирован только при имплантации фрагмента опухоли у 1/10 мышей. В первичных опухолях, ксенографтах и гематогенном метастазе были определены идентичные фенотипы опухолевых клеток. Тем не менее доля CD45<sup>+</sup>ErCam<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>N<sup>-</sup>cadh<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>ErCam<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>N<sup>-</sup>cadh<sup>+</sup> клеток в первичной опухоли и гематогенном метастазе возросла с 2,53 кл/мл до 27,42 кл/мл и с 1,44 кл/мл до 27,39 кл/мл соответственно. При гистологическом анализе выявлено, что ксенографты представляли собой инкапсулированные образования из клеток с умеренно выраженным полиморфизмом, отмечены ядра овоидной и неправильной формы, со слабо выраженной цитоплазмой без четкой границы. Гематогенный метастаз, возникший в послеоперационный период в забрюшинной клетчатке, был образован диффузными полями резко анаплазированных клеток опухоли с ядрами овоидной и неправильной формы с мелкодисперсным хроматином и наличием мелких ядрышек.

### Заключение

Молекулярный портрет клеток первичной опухоли, ксенографтов и метастаза оказался идентичен и представлен CD45<sup>+</sup>ErCam<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>N<sup>-</sup>cadh<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>ErCam<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>N<sup>-</sup>cadh<sup>+</sup> фенотипами, однако выявлены существенные различия на количественном уровне популяций опухолевых клеток.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-30016).

**АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ФЕРРОПТОТИЧЕСКИ-ИНДУЦИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ГЛИОМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RSL3\***

В. Д. Турубанова<sup>1,2</sup>, М. О. Савюк<sup>1</sup>, Е. Е. Слепцова<sup>1</sup>, Т. С. Редькин<sup>1</sup>, М. В. Ведунова<sup>1</sup>, Д. В. Крысько<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

<sup>2</sup>Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT),  
кафедра анатомии и регенерации человека, Гентский университет, Бельгия

<sup>3</sup>Институт исследований рака, Гент, Бельгия

**Аннотация**

Концепция иммуногенной клеточной смерти опухолевых клеток получила свое развитие в области создания дендритноклеточных вакцин от первичных опухолей головного мозга. Сигналы опасности, испускаемые погибающими раковыми клетками, влияют на привлечение дендритных клеток к опухолевый очаг. Иммуногенно-погибающие трансформированные клетки дают мощный стимул для активации антигенпрезентирующих клеток, которые, в свою очередь, стимулируют T-клеточный противоопухолевый ответ.

Фундаментальной научной проблемой является поиск альтернативных форм индукции клеточной смерти трансформированных клеток в ходе цитотоксической терапии, обладающих иммуногенными свойствами и способствующих эффективному уничтожению опухолевых клеток. Существующие данные об иммуномодулирующей роли ферроптотических опухолевых клеток в формировании противоопухолевого иммунитета в настоящее время крайне малы [Angeli J.P.F. et al. // Nat. Rev. Cancer. 2019], что диктует необходимость проведения дальнейших исследований. Таким образом, целью являлся анализ профиля и уровня экспонирования DAMPs (кальретикулин, АТФ, HMGB1) при ферроптотической гибели опухолевых клеток и определение роли каждого из исследуемых DAMPs в проявлении иммуногенного эффекта, направленного на предотвращение роста опухолевых клеток.

Для индукции ферроптоза в клетках глиомы GL261 использовался RSL3 в концентрации 1,8 мкМ, что соответствовало концентрации IC85. Этот важный результат был получен в результате оценки цитотоксичности вещества на культурах при инкубации 24 часа после индукции.

Показано высвобождение ключевых DAMP's в процессе клеточной гибели: АТФ и HMGB1. А также цитофлуорометрическим анализом экспонирование молекул кальретикулина на плазматической мембране. Интенсивное высвобождение сигналов опасности может говорить об иммуногенном потенциале клеточной гибели. Анализ активации антигенпрезентирующих клеток помогает оценить иммуногенность клеточной гибели и возможность презентации опухолевого антигена T-клеточной популяции. Процент клеток, обогащенный молекулами CD40, CD80 и CD86 на поверхности плазматической мембраны, оценивается цитофлуорометрически.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00376, <https://rscf.ru/project/22-15-00376/>  
© В. Д. Турубанова, М. О. Савюк, Е. Е. Слепцова, Т. С. Редькин, М. В. Ведунова, Д. В. Крысько, 2022

## ФИБРОБЛАСТЫ И ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ИЗМЕНЯЮТ СВОЙ ФЕНОТИП ПРИ ОБРАБОТКЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК \*

А. А. Филатова<sup>1,2</sup>, Л. А. Алексеева<sup>1</sup>, М. А. Зенкова<sup>1</sup>, Н. Л. Миронова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ a.filatova2@ngs.ru

### Аннотация

Накоплено множество данных, свидетельствующих о том, что концентрация и профиль внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови онкологических больных и здоровых доноров значительно отличается. Профиль опухолеассоциированной вкДНК обогащен ретротранспозонами, мутантными последовательностями онкогенов, гиперметилированными последовательностями и многим другим. Некоторые исследователи полагают, что вкДНК может изменять фенотип нормальных клеток, способствовать формированию микроокружения опухоли и премеастатической ниши и даже вызывать клеточную трансформацию. Вопрос о способности опухолевой вкДНК усиливать инвазивный потенциал клеток все еще остается дискуссионным.

Для изучения возможности вкДНК влиять на инвазивный потенциал опухолевых клеток мы обработали клетки мышинной меланомы B16-F10 вкДНК из двух разных источников — из сыворотки крови здоровых мышей (Н-вкДНК) и из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой (B16-вкДНК). B16-вкДНК вызвала значимое увеличение уровня мРНК N-RAS и вместе с тем слабое увеличение уровней мРНК некоторых других онкогенов (FOS, JUN, C-MYC). Более того, наблюдалось увеличение уровней мРНК ряда эндогенных ДНКаз (DFFB, ENDOG), а также уровень мРНК гена DNASE1L3 значительно уменьшился. Неожиданно было обнаружено, что обработка клеток B16-F10 Н-вкДНК вызывает увеличение уровней мРНК всех исследованных онкогенов в 10 раз относительно контроля. В отличие от обработки B16-вкДНК обработка клеток Н-вкДНК стимулирует экспрессию секреторной DNASE1L3 и не влияет на эндогенные ДНКазы. Мы можем заключить, что клетки B16-F10 демонстрируют устойчивость к вкДНК того же происхождения (преимущественно B16-вкДНК происходит из циркулирующих клеток B16 и клеток метастатических очагов B16) и кажутся более восприимчивыми к вкДНК от нетрансформированных клеток. Интересно, что добавление к клеткам B16-F10 Н-вкДНК увеличивало миграционную активность.

Для оценки влияния опухолевой вкДНК на нетрансформированные клетки мы обработали человеческие фибробласты HFF-3 вкДНК, выделенной из кондиционированной среды клеток B16-F10 (CdB16-вкДНК). CdB16-вкДНК значимо увеличивает уровни РНК ДНКаз (DNASE1L1, DNASE1L3, ENDOG) и некоторых онкогенов (JUN, K-RAS, N-RAS). Однако CdB16-вкДНК также уменьшала уровень РНК онкогена FOS. Более того, мы заметили двукратное увеличение экспрессии LINE-элемента L1TD1. Влияния CdB16-вкДНК на миграционную активность и жизнеспособность клеток обнаружено не было. Эффект CdB16-cfDNA на клетки HFF-3 прекращалось при добавлении в среду экзогенной ДНКазы I.

Установлено, что опухолеассоциированная вкДНК может менять фенотип нормальных клеток на опухолеспецифический, в то время как вкДНК нормальных клеток может активировать опухолевые клетки и усиливать их злокачественные свойства. Для понимания механизмов, лежащих в основе наблюдаемых эффектов, необходимы дальнейшие исследования.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-14-00289.

© А. А. Филатова, Л. А. Алексеева, М. А. Зенкова, Н. Л. Миронова, 2022

## ИНДУКЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ T-КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРА CDK8/19 AS2863619\*

М. С. Фишер, А. С. Булыгин, Ю. Н. Хантакова, В. В. Курилин, В. П. Терещенко, С. В. Сенников

*Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск*

✉ msolshanova@gmail.com

**Аннотация**

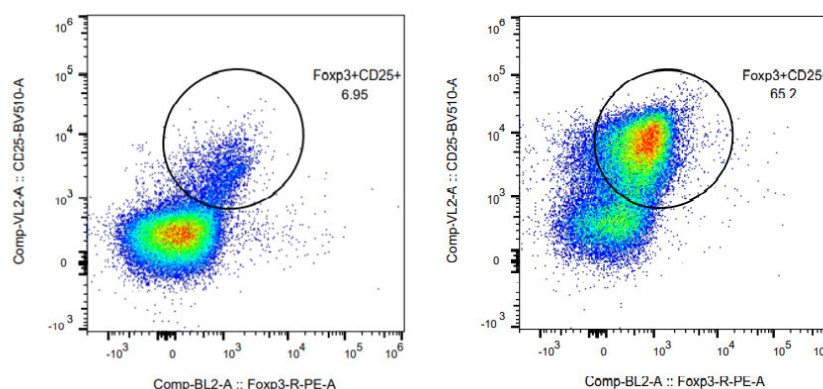
ФохP3+T-регуляторные (Treg) клетки являются гетерогенной популяцией, участвующие в контроле иммунного ответа. Ингибирование CDK8 и CDK19 с помощью AS2863619 способствует трансдифференцировке антиген-специфических эффекторных T-клеток в сторону ФохP3+Treg. В популяции CD4+ T-лимфоцитов при использовании AS2863619 количество Treg-клеток увеличивается в 10 раз. Среди них преобладают Treg-клетки с фенотипом резидентной и эффекторной памяти.

Тимические Treg(nTreg)-клетки, несущие аутореактивный T-клеточный рецептор (TCR), имеют решающее значение для поддержания аутоотолерантности. В тимусе в ходе положительной селекции образуются аутореактивные T-клетки. На стадии негативной селекции часть из них благодаря индукции ФохP3 дифференцируется в функционально зрелые nTreg, впоследствии мигрирующие на периферию для индукции толерантности к собственным антигенам. Существенный фактор, препятствующий экспрессии гена ФохP3+, — это циклин-зависимая киназа (CDK) CDK8 и его паралог CDK19. Эти киназы в сочетании с комплексом ядерного медиатора участвуют в транскрипции и внутриклеточной передаче сигналов. CDK8/19 и/или CDK19 экспрессируются вне зависимости от стимулирования TCR. Предполагается, что данные киназы могут подавлять экспрессию ФохP3 даже в активированных эффекторных T-клетках. И наоборот, ингибирование циклинзависимых киназ (CDK)8 и CDK19 увеличивает экспрессию гена ФохP3+ и способствует трансдифференцировке эффекторных T-клеток в сторону ФохP3+Treg.

**Целью** нашего исследования является оценка возможности перепрограммирования эффекторных T-клеток в сторону Treg с помощью ингибитора CDK18/19 AS2863619.

**Материал и методы.** Из спленоцитов мышей BALB/c методом магнитной сортировки выделяли CD4+-лимфоциты. Миллион лимфоцитов культивировали в 1 мл полной RPMI с добавлением анти-CD3-антител 5 мкг/мл, TGF- $\beta$  2,5 нг/мл, IL-2 300 ед/мл и 1 мкМ концентрацией AS2863619. На третьи сутки клетки окрашивались поверхностно антителами анти-CD3, анти-CD4, анти-CD25 и внутриклеточно — анти-ФохP3-антителами. Анализ проводили методом проточной цитометрии. Для анализа субпопуляций памяти полученных ФохP3+ Treg-клеток использовались следующие антитела: анти-CD3, анти-CD4, анти-CD25, анти-CD44, анти-CD62L, анти-CD95, анти-CD122, анти-CD69, анти-CD103 и анти-ФохP3.

**Результаты исследования.** При культивировании CD4+ T-лимфоцитов только при одновременном воздействии анти-CD3 и AS2863619 происходит 10-кратное увеличение относительного количества CD25<sup>hi</sup>ФохP3+ Treg-клеток. В остальных группах количество Treg-клеток увеличивается незначительно (см. рисунок).



Индукция Treg-клетки без стимуляции (слева) и индукция Treg-клетки с стимуляцией (справа)

\* Исследование проводилось при поддержке гранта РФФ № 21-75-10089.

Цитометрический анализ Treg-клеток, полученных при стимуляции анти-CD3+AS2863619, показал, что  $49,2 \pm 4,42$  % Treg-клеток составляли CD44+CD62L-CD69-CD103-Tem/ CD44+CD62L- CD69+D103+ Trm-клетки памяти. При этом среди них  $55,1 \pm 2,52$  % составляют Trm-резидентные T-клетки памяти, обладающие способностью к хоумингу в нелимфоидные органы и ткани и длительно сохраняющиеся в организме. В оставшейся части Treg-клеток присутствовало относительно большое количество низкодифференцированных наивных T-клеток (CD44-CD62L+,  $12,2 \pm 1,61$  %) и T-клеток центральной памяти (CD44+CD62L+  $29,4 \pm 2,97$  %), наличие которых в клеточном препарате может приводить к повышению его эффективности. Также среди полученных Treg-клеток наблюдалось относительно небольшое количество стволовых T-клеток памяти (CD44-CD62L+CD122+,  $2,19 \pm 1,01$  %).

Таким образом, можно сказать, что ингибирование CDK8/19 у стимулированных лимфоцитов способствует индукции Treg-клеток памяти, которые могут значительно увеличить возможности их применения в трансплантологии.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФУЛЬВОКИСЛОТ ЧЕРНОЗЕМА ЮЖНОГО НА ПОЛИМЕРАЗНУЮ ЦЕПНУЮ РЕАКЦИЮ ПРИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ\***В. С. Флоринская<sup>1</sup>, И. В. Корниенко<sup>1,2</sup>, О. Ю. Арамова<sup>1,2</sup>, О. С. Безуглова<sup>1</sup><sup>1</sup>Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону<sup>2</sup>ФИЦ «Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону

✉ florinskayavs@gmail.com

**Аннотация**

Водорастворимые фульвокислоты — неотъемлемый компонент почв, в толще которых обнаруживаются древние костные останки. В связи с этим исследование их влияния на ПЦР становится актуальным. Среди всех изученных конечных концентраций фульвокислот чернозема южного их ингибирующая способность возрастает с увеличением концентрации. Максимальное ингибирование отмечается при концентрации 100 нг/мкл.

Следствием активной археологической деятельности на территории Юга России является повышенный интерес к палеогенетическим исследованиям древних костных останков. Исследования такого рода позволяют установить генетические характеристики представителей древних популяций и решить многие спорные исторические вопросы [1]. Учитывая, что биологический материал для палеогенетических исследований, как правило, обнаруживается в толще почвы, он зачастую оказывается ингибирован ее компонентами, в числе которых фульвокислоты (ФК) — водорастворимая фракция гумуса и неотъемлемый компонент всех почв и почвенных горизонтов. На территории Ростовской области преобладающим типом почв являются черноземы, занимающие около 62 % всех почв региона [2]. Исходя из вышесказанного, изучение влияния ФК на полимеразную цепную реакцию (ПЦР) становится особенно актуальным. Кроме того, как показал анализ литературных данных, информация, описывающая эффект ФК на ПЦР, весьма малочисленна.

Целью данного исследования являлось установление влияния фульвокислот в разных концентрациях на протекание полимеразной цепной реакции. В работе были использованы ФК, выделенные по методу Форсита [3] из трех почвенных горизонтов (A<sub>пахотный</sub>, В и С) чернозема южного.

Оценку влияния ФК в различных концентрациях на протекание ПЦР «в реальном времени» проводили с использованием коммерческой тест-системы «ХУ-Детект» и набора реактивов «Eva Green» совместно со специфичными праймерами HBG 120 (Human beta globin 120 н.п.).

Результаты, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о том, что среди всех исследованных конечных концентраций ФК (10, 20, 50 и 100 нг/мкл) их ингибирующая способность возрастает при увеличении их концентрации вне зависимости от горизонта, из которого они были выделены. Нижняя граница, при которой отмечается значительное ингибирование, — 50 мкг/мл, а верхняя, при которой ингибирование максимальное, — 100 нг/мкл. Стоит отметить, что ФК из горизонта В данной почвы полностью ингибировали ПЦР с использованием набора реактивов «Eva Green» уже при их конечной концентрации 20 нг/мкл. Это свидетельствует о возможных особенностях химической структуры ФК горизонта В, отличающих их от ФК других горизонтов.

Отметим важность применения дополнительных манипуляций по уменьшению ингибиторного действия ФК на ПЦР в случае, когда биологические образцы обнаруживаются в любом из почвенных горизонтов (A<sub>пахотный</sub>, В или С) чернозема южного.

**Литература**

1. Молекулярно-генетическая идентификация безымянных захоронений первой половины XVI в. из некрополя Вознесенского собора Московского Кремля / И. В. Корниенко, Т. Д. Панова, Т. Г. Фалеева и др. // Генетика. 2022. Т. 58. № 2. С. 206–218.
2. История и современное состояние районирования почвенного покрова Ростовской области / В. С. Крыщенко, И. В. Замулина, О. М. Голозубов, Ю. А. Литвинов // Фундамент. исслед. 2012. № 5-2. С. 415–421.
3. Орлов Д. С., Гришина Л. А., Ерошичева Н. Л. Практикум по биохимии гумуса. М.: МГУ, 1969. 157 с.

\* Пробоподготовка образцов была выполнена в рамках реализации госзадания ЮНЦ РАН, гр. проект № 122011900166-9, молекулярно-генетические исследования — в рамках гранта РФФИ 22-28-02000.

## ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА МОНОНУКЛЕАРОВ В ДИНАМИКЕ ХИМИОТЕРАПИИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\*

А. А. Фролова<sup>1,2</sup>, Т. С. Геращенко<sup>1</sup>, М. Р. Патышева<sup>1,2</sup>, О. Д. Брагина<sup>1</sup>, Н. В. Чердынцева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН

<sup>2</sup>Томский государственный университет

✉ frolova\_aa@onco.tnmc.ru

### Аннотация

Иммунная система принимает активное участие в опухолевой прогрессии и ответе на лечение злокачественных новообразований, в том числе и рака молочной железы. В настоящей работе охарактеризовано изменение субпопуляционного состава мононуклеаров крови больных трижды негативным раком молочной железы (ТНРМЖ) в динамике химиотерапии. Показано, что после введения первой химиотерапевтической дозы происходит изменение транскриптома клеток. Это подтверждает важность изучения компонентов иммунной системы для корректной оценки прогноза лечения.

Трижды негативный рак представляет собой наиболее агрессивный и иммуногенный подтип рака молочной железы и составляет около 20 % от всех карцином [1]. Основным методом лечения ТНРМЖ является системная химиотерапия, тем не менее, ввиду высокой гетерогенности данного подтипа, ее эффективность остается низкой [2]. Рядом исследований показана вовлеченность клеток иммунной системы в реализацию эффектов конвенциональных препаратов, применяемых при терапии ТНРМЖ [3]. Целью настоящей работы явилось изучение изменения субпопуляционного состава мононуклеаров у больных ТНРМЖ в динамике неoadъювантной химиотерапии (НАХТ).

### Материалы и методы

Мононуклеары периферической крови были получены из венозной периферической крови больной ТНРМЖ с последующим обогащением на градиенте плотности фиккол-урографина (плотность 1,077 г/см<sup>3</sup>) и хранились при -80°C не более трех месяцев. НАХТ проводилась по схеме АС (доксорубин + циклофосфамид), забор крови производился после установления диагноза (до начала лечения), через 3 и 21 сутки после введения 1-го курса. Секвенирование единичных клеток проводилось на платформе NextSeq 2000 (Illumina, США) по технологии Rhapsody Express (Becton Dickenson, США) с использованием таргетной панели Immune Response. Биоинформатическая обработка производилась с помощью SevenBridges (<https://www.sevenbridges.com/apps-and-pipelines/>), кластерный анализ — с применением пакета Seurat в среде R/Bioconductor, анализ дифференциальной экспрессии — встроенным пакетом DESeq2.

### Результаты

В ходе кластерного анализа было обнаружено девять специфических субпопуляций лимфоидных и миелоидных клеток, которые количественно изменялись в динамике терапии. Показано, что через трое суток пул мононуклеарных клеток селективно истощался за счет механизмов апоптоза, ассоциированных с геном ВАХ. Однако через 21 сутки после 1-го курса НАХТ мононуклеарные клетки дифференцированно восстанавливались: количество моноцитов увеличивалось при истощении пула Т-лимфоцитов. Кроме того, после НАХТ в моноцитах происходило изменение уровня экспрессии генов CD14, S100A9, CXCL8, HLA-DRA, FCN1, отвечающих за провоспалительную активацию. Полученные данные свидетельствуют о динамическом изменении субпопуляционного состава клеток системного иммунитета в ходе НАХТ.

### Вывод

В ходе реализации ответа на НАХТ происходит изменение количественного состава пула моноцитов, Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток, а также модификация транскриптомного профиля моноцитов в сторону провоспалительной активации.

### Литература

1. Qiu S., Hong R. et al. A Single-Cell Immune Atlas of Triple Negative Breast Cancer Reveals Novel Immune Cell Subsets // Research Square. 2020. V. 1. P. 1–30.
2. Abramson V. G., Mayer I.A. Molecular Heterogeneity of Triple Negative Breast Cancer // Current Breast Cancer Reports. 2014. V. 6(3). P. 154–158.
3. Vaxevanis C.N., Fortis S.P., Perez S.A. The balance between breast cancer and the immune system: challenges for prognosis and clinical benefit from immunotherapies // Seminars in Cancer Biology. 2019. P. 1–14.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ №22-75-10128.



## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК В ГЕНАХ СИСТЕМЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРЕПАРАТАМ ПЛАТИНЫ НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* \*

А. А. Фролова<sup>1,2</sup>, М. К. Ибрагимова<sup>1,2</sup>, М. М. Цыганов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН

<sup>2</sup>Томский государственный университет

✉ frolova\_aa@onco.tnmc.ru

### Аннотация

Карциномы молочной железы способны развивать устойчивость к различным химиопрепаратам и прогрессировать до более агрессивного фенотипа в зависимости от статуса гомологичной рекомбинации. Настоящее исследование подтверждает взаимосвязь наличия дефицита ГР и низкой устойчивости опухолевых клеток к препаратам платины. Полученные данные могут использоваться в качестве прогностических маркеров ответа опухоли на химиотерапию.

### Введение

Химиотерапия является одним из основных методов лечения рака молочной железы [1]. Однако не всегда наблюдается положительный ответ на терапию в связи с наличием резистентности в различных опухолях. Определение механизмов развития резистентности опухолевых клеток является чрезвычайно важной задачей. Известно, что дефицит гомологичной рекомбинации может привести к возникновению мутаций [2]. Предыдущие наши исследования на опухолях молочной железы и легкого показали, что наличие делеции *BRCA1* и/или его низкой экспрессии обуславливает повышенную чувствительность к химиотерапии с включением препаратов платины. Для углубленного понимания взаимосвязи между эктопической экспрессией генов гомологичной рекомбинации (ГР), обусловленной амплификациями и делециями данных генов, и развитием химиорезистентности необходимо изучить способность опухолевых клеток к прогрессии после воздействия препаратом платиновой группы — цисплатина. Таким образом, цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния хромосомных aberrаций генов ГР на химиочувствительность опухолевых клеток к цисплатину.

### Материал и методы

В качестве опухолевых клеточных линий были использованы клетки рака молочной железы — MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47, SKBR-3. Клетки культивировались в стандартных условиях в 6-луночных планшетах, добавление химиопрепарата производилось через 4 часа после посева. Оценка пролиферативной активности опухолевых клеток осуществлялась с помощью системы многопараметрического анализа клеточных культур в режиме реального времени — RTCA iCELLigence. Регистрация клеточного индекса проводилась каждые 15 минут в течение 48 часов. В качестве химиопрепарата использовался цисплатин в концентрациях 10, 20 и 30 мкг/мл. Анализ CNA-генетического ландшафта проводился с использованием микроматриц CytoScan HD Array, транскриптомный анализ осуществлялся на платформе Clariom S Assay.

### Результаты

Анализ CNA-генетического ландшафта показал, что у таких культур опухолевых клеток, как MCF-7, MDA-MB-231, T-47, SKBR-3, имеется делеция в различных генах ГР (табл. 1). В ходе исследования клеточной гибели опухолевых клеток молочной железы было обнаружено, что наличие делеции в таких генах ГР как: *BRCA1*, *ATM*, *CDK12*, *CHEK1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD54L*, снижает пролиферацию клеток в ответ на действие цисплатина. Установлено, что для MCF-7, MDA-MB-231, T-47, SKBR-3 наблюдается аналогичная картина гибели более 50 % клеток через 10 часов после добавления препарата в минимальной концентрации (10 мкг/мл). По прошествии 48 часов не наблюдается восстановления клеточного роста в опытных группах, что свидетельствует об отсутствии механизмов сопротивления и развития химиорезистентности данных клеточных линий.

Напротив, для опухолевых клеток MDA-MB-468 нехарактерно снижение пролиферации после добавления цисплатина. Рост клеток практически совпадает между контрольной и опытными группами. При анализе CNA-генетического ландшафта было обнаружено, что только в указанной клеточной линии отсутствуют делеции генов ГР (см. таблицу). Полученные данные свидетельствуют о влиянии генов ГР на развитие химиорезистентности опухолей молочной железы.

\* Работа поддержана грантом РФФ 22-15-00169.

© А. А. Фролова, М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов, 2022

### Генетический ландшафт клеточных линий рака молочной железы

Ген	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468	T-47D	SK-BR-3
	CNA	CNA	CNA	CNA	CNA
BRCA1	Loss	n	n	Gain	Loss
BRCA2	n	Loss	n	Loss	n
ATM	Loss	n	Gain	Gain	n
BARD1	n	Loss	n	Loss	n
BRIP1	Gain	n	n	Gain	Loss
CDK12	Loss	n	n	Gain	Gain
CHEK1	Loss	n	Gain	Gain	n
CHEK2	n	Loss	n	Loss	n
FANCL	n	n	n	Loss	n
PALB2	n	Loss	n	n	n
PPP2R2A	n	n	n	Loss	n
RAD51B	Gain	n	n	Gain	Gain
RAD51C	Gain	n	n	Gain	Loss
RAD51D	Loss	n	n	Gain	Loss
RAD54L	n	Loss	Gain	Loss	Gain
PARP1	n	n	Gain	Gain	Gain

*Примечание:* Loss — делеция, gain — амплификация, n — нормальная копия гена.

#### Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что химиочувствительность опухолевых клеток молочной железы зависит от наличия aberrантного состояния генов системы гомологичной рекомбинации. Обнаружено, что оценка ГР может иметь высокий предиктивный и прогностический потенциал для терапии рака молочной железы препаратами платины.

#### Литература

1. Lainetti P.F., Leis-Filho A.F. et al. Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Breast Cancer and Possible Targets in Drug Delivery Systems // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12 (1193). P. 1–20.
2. Creeden J.F., Nanavaty N.S. et al. Homologous recombination proficiency in ovarian and breast cancer patients // *BMC Cancer*. 2021. V. 21 (1154). P. 1–54.

**ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДА НОВОГО СТРУКТУРНОГО КЛАССА ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ, МОДУЛИРУЮЩЕГО РАБОТУ КИСЛОТЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО КАНАЛА 1А-ТИПА\***Т. А. Хасанов<sup>1,2</sup>, Д. И. Осмаков<sup>1,3</sup>, Я. А. Андреев<sup>1,3</sup>, С. А. Козлов<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии, Москва<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

Email:Khasanov.ta@mipt.ru

Кислоточувствительные ионные каналы (ASIC-каналы) относятся к надсемейству амилоридчувствительных дегенерин/эпителиальных Na<sup>+</sup>-каналов. Одна из изоформ каналов, ASIC1a, широко представлена как в центральной, так и в периферической нервной системе. ASIC1a-каналы участвуют в различных физиологических (синаптическая пластичность, обучение, ноцицепция) и патологических (ацидоз, ишемия, воспаление) процессах организма. Яды животных являются богатым источником различных лигандов этих каналов. Так, из яда морской анемоны *Metridium senile* выделен и изучен новый пептидный селективный модулятор ASIC1a-каналов. Пептид, названный MS54, получен в результате трехстадийного разделения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлена первичная структура пептида, для которой не найдено гомологов среди других пептидных молекул. Методом ЯМР-спектроскопии установлена третичная структура пептида, имеющая новый тип пространственной укладки. Для более масштабных исследований отработана схема получения рекомбинантного аналога пептида. С помощью электрофизиологических испытаний, проводившихся на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих ASIC1a-каналы, показано, что MS54 является позитивным аллостерическим модулятором, в наномолярных концентрациях связывающимся с каналом. MS54 дозозависимо потенцирует ответ на кислотный стимул pH 6,7 со значением полумаксимальной эффективной концентрации пептида EC<sub>50</sub>, которая равна 168 нМ (коэффициент Хилла  $n = 0,51$ ). Пептид не влияет на константу pH полуактивации и не конкурирует с протонами за сайты связывания с рецептором. Таким образом, найден новый модулятор ASIC1a-каналов, который не только открывает новую группу пептидных лигандов, но и служит перспективным инструментом для изучения этой группы каналов.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-75-10021.

© Т. А. Хасанов, Д. И. Осмаков, Я. А. Андреев, С. А. Козлов, 2022

## СИСТЕМЫ ПЦР-РВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДНК В ОБРАЗЦАХ СЦДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ\*

А. С. Хромова, А. П. Коваль, К. А. Благодатских, Д. С. Щербо

*НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва*

✉ sashachromova@gmail.com

### Аннотация

Анализ свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), выделенной из плазмы крови, дает возможность разработать методики малоинвазивного скрининга ряда онкологических заболеваний. Однако есть ряд проблем, которые усложняют процесс анализа и ухудшают качество результатов, например загрязнение анализируемого образца геномной ДНК из-за разрушения клеток крови при гемолизе в случае его длительного хранения в неподходящих условиях или при неправильном взятии венозной крови. В данной работе проводилась проверка работы системы олигонуклеотидных праймеров и зондов для определения наличия высокомолекулярной ДНК с помощью ПЦР в реальном времени.

### Методы

Для проверки контаминации геномной ДНК образцов сцДНК были разработаны две системы олигонуклеотидных праймеров (прямого и обратного) и зондов для амплификации коротких (106 п.о. — ДНК интереса) и длинных фрагментов (612 п.о. — высокомолекулярная ДНК). В качестве целевых фрагментов были выбраны стабильные межгенные участки генома, встречающиеся в нескольких копиях. Необходимость выбора многокопийного участка обусловлена требованием к высокой чувствительности системы в условиях небольшого количества сцДНК. Проверка работы систем проводилась с помощью ПЦР в реальном времени со следующими параметрами:

1. Денатурация — 95°C в течение 3 минут и 95°C в течение 10 секунд после первого цикла.
2. Отжиг — 58°C в течение 30 секунд.
3. Элонгация — 58°C в течение 30 секунд.

Этапы отжига и элонгации шли одновременно; всего реакция протекала 50 циклов. В реакции использовались смеси, состоящие из зондов и праймеров (по 1 мкл каждого в соответствии с системой), полимеразной смеси (Taq-полимераза с азотистыми основаниями, по 5 мкл), образцы сцДНК и сверхчистая вода в различных соотношениях (в зависимости от итоговой концентрации ДНК в реакции). Общий объем реакции составил 25 мкл. Полученные данные по представленности коротких и длинных фрагментов ДНК анализировались с помощью ПО BioRad CFX Manager 3.1. Оценка экспрессии фрагментов проводилась с помощью метода Delta-Delta Ct, и на её основе рассчитывался процент контаминации для каждого образца.

### Результаты

Проверка системы проводилась в три этапа.

1. Постановка ПЦР в реальном времени модельных образцов с разным соотношением фрагментированной и нефрагментированной ДНК (50, 25, 5, 1 %). Использовалась нефрагментированная ДНК из клеточной линии Raji (доведена до концентрации 1 нг/мкл) и фрагментированная на системе ультразвуковой фрагментации Covaris ДНК из этой же клеточной линии (доведена до концентрации 1 нг/мкл). Средняя длина фрагментов ДНК после обработки ультразвуком составила 200 п.о. Для каждого образца был рассчитан процент контаминации, и полученные результаты о наличии высокомолекулярной ДНК в образцах с разным соотношением фрагментированной и нефрагментированной ДНК сошлись с данными о их реальных долях в препаратах.

2. Анализ содержания высокомолекулярной ДНК в образцах сцДНК из плазмы, выделенной на различных сроках хранения крови (0, 4, 7, 10 дней, всего было проанализировано 8 образцов). В качестве стандарта сравнения при постановке реакции был использован ранее полученный образец ДНК с известной долей высокомолекулярной ДНК (50 %). Как и на первом этапе, для каждого образца был рассчитан процент контаминации, и на его основе был сделан вывод о количестве высокомолекулярной ДНК в образце. Разработанная система выявила ожидаемое возрастание доли геномной ДНК при увеличении длительности хранения крови.

3. Постановка ПЦР в реальном времени с использованием в качестве матрицы сцДНК, выделенной из клинических образцов плазмы крови. В качестве стандарта сравнения при постановке реакции также был исполь-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-75-10008.

© А. С. Хромова, А. П. Коваль, К. А. Благодатских, Д. С. Щербо, 2022

зован ранее полученный образец ДНК с известной долей высокомолекулярной ДНК (50 %). Всего было проанализировано четыре клинических образца. На основе расчетов процента контаминации сделан вывод о высоком содержании высокомолекулярной ДНК в двух препаратах сцДНК.

### **Выводы**

Система может быть использована для определения доли высокомолекулярной ДНК (система выявила ожидаемую долю высокомолекулярной ДНК в образцах с разным соотношением фрагментированной и нефрагментированной ДНК и предполагаемое возрастание доли высокомолекулярной ДНК в образцах, полученных из плазмы при увеличении длительности хранения крови) и пригодности препарата для последующего анализа образцов сцДНК. Тем не менее, необходима дальнейшая валидация системы для улучшения точности результатов и разработки возможных модификаций.

## ANTENNA-EQUIPPED DEOXYRIBOZYME MACHINE FOR ULTRA-SENSITIVITY AMPLIFICATION-FREE DETECTION OF SARS-COV-2 RNA\*

Z. Hussein<sup>1</sup>, A.A. Eldeeb<sup>1</sup>, D.M. Kolpashchikov<sup>2-4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Robotics and Biosensor Materials, SCAMT Institute, ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Chemistry Department, University of Central Florida, Florida, USA

<sup>3</sup>Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Florida, USA

<sup>4</sup>National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Florida, USA

✉ zain@scamt-itmo.ru

### Abstract

A binary deoxyribozyme-based DNA machine equipped with four RNA-binding arms and two reporter substrate-attracting hooks was designed for the amplification-free detection of SARS-CoV-2 RNA with improved sensitivity than its ancestors. The addition of hooks significantly reduces the limit of detection (LOD) as it reached the femtomolar range, which has never been reached using deoxyribozyme.

Various hybridization probes have been widely used for the identification of DNA and RNA sequences. However, these probes show inadequate sensitivity because of the stability of their targets [1]. Luckily, deoxyribozymes, which are synthetic single-stranded DNA oligonucleotides identified by *in vitro* selection, can be considered as a promising diagnostic tool due to their higher sensitivity, as they are able to amplify the positive signal over time, in addition to their high selectivity, biocompatibility, stability, low cost of synthesis, and ease of modification and structure prediction [2, 3]. We based our work on a binary RNA-cleaving deoxyribozyme (Fig. 1A) which is composed of single strands of DNA molecules that form a sensor of two main parts, the catalytic core which cleaves a reporter substrate, and the analyte-binding part which binds to the target by forming Watson-Crick base pairs. We equipped our DNA machine with 4 analyte-binding arms and a substrate delivery system as two reporter substrate-attracting hooks (Fig. 1B).

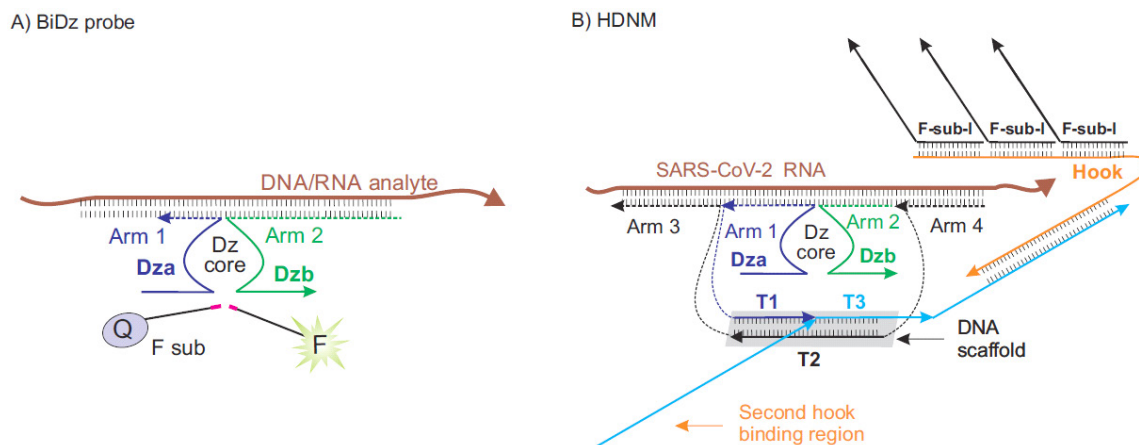


Fig. 1. Principle of the binary deoxyribozyme: two DNA stands, Dza and Dzb, bind DNA/RNA analyte and form the catalytic core that cleaves fluorophore (F) and quencher (Q) labelled reporter substrate (F sub). In the presence of the target, an increase in the fluorescence can be detected due to the separation of the fluorophore from the quencher after cleavage (A); our DNA machine (named HDNM) has a double stranded DNA scaffold (shaded grey) connecting Arm 3, Arm 4, and T3 with the catalytic core. Arms 3 and 4 are designed to bind natural RNA, thus unwinding its secondary structure. T3 has two hook-binding regions. Each hook can attract 3 long reporter substrates (F-sub-1) (Second hook is not shown) (B)

Our advanced DNA machine allows the successful unfolding and binding with SARS-CoV-2 viral RNA due to its 4 analyte-binding arms, and it has also shown a remarkable decrease in LOD comparing with the machine lacking the substrate delivery system, as it was characterized with an LOD of 0.025 pM after 3h of incubation at 55 °C with the synthetic DNA analyte comparing with the machine lacking the substrate delivery system, which was characterized with an LOD

of 2 pM under the same conditions (Fig. 2), which in turn proves the sensitivity enhancement that the hooks can provide. We also plan to introduce our DNA machine into a multivalent system consisting of several catalytic cores, which will help in the unwinding process, and reduce the incubation time, and will further reduce LOD until we reach a level where our diagnostic test that we have developed can replace the polymerase chain reaction (PCR) in diagnostics.

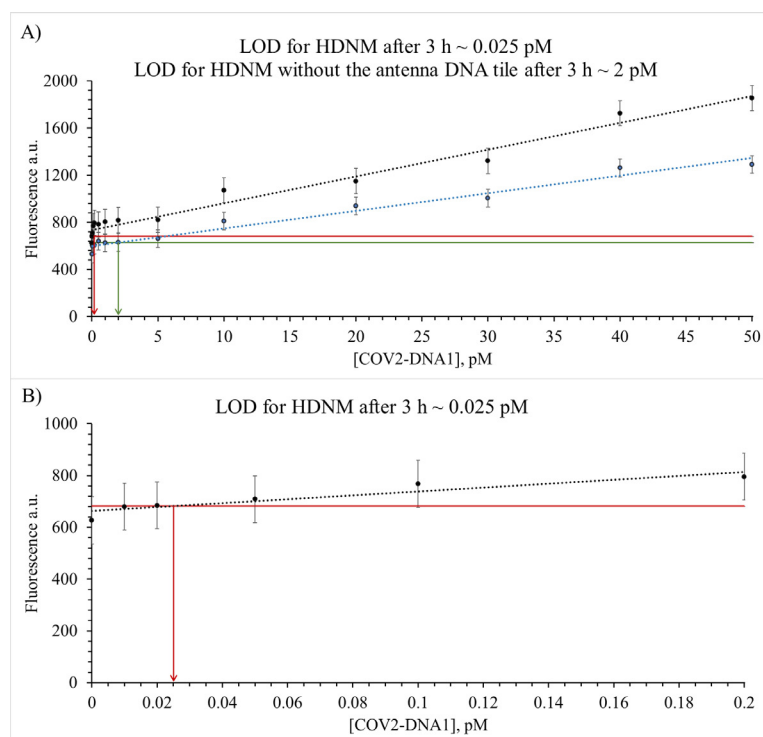


Fig. 2. LOD for COV2-DNA1 (RdRp gene, 15398-15487) of HDNM with and without the addition of hooks after 3h of incubation over the full range of concentrations of analyte (A); LOD for COV2-DNA1 of HDNM after 3h in a small range of concentrations of the analyte to demonstrate LOD. The data are average values of three independent measurements (B)

## References

1. Cox A.J. et al. DNA nanotechnology for nucleic acid analysis: multifunctional molecular DNA machine for RNA detection // Chem. Commun. 2016. Vol. 52, № 99. P. 14318–14321.
2. Kolpashchikov D.M. A Binary Deoxyribozyme for Nucleic Acid Analysis // Chem. BioChem. 2007. Vol. 8. № 17. P. 2039–2042.
3. Gerasimova Y.V., Cornett E., Kolpashchikov D.M. RNA-Cleaving Deoxyribozyme Sensor for Nucleic Acid Analysis: The Limit of Detection // Chem. BioChem. 2010. Vol. 11. № 6. P. 811–817.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ КАРБОАНГИДРАЗ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТЕРАПИИ САРКОМЫ ЮИНГА\*

С. В. Цибульников<sup>1</sup>, Д. Р. Файзуллина<sup>1</sup>, М. Ю. Степень<sup>1</sup>, Д. А. Анискин<sup>1</sup>, К. И. Киргизов<sup>2</sup>, О. М. Романцова<sup>2</sup>,  
С. А. Калинин<sup>3</sup>, А. А. Недорубов<sup>1</sup>, М. Ю. Красавин<sup>3</sup>, П. С. Тимашев<sup>1</sup>, И. В. Уласов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет  
им. И. М. Сеченова Минздрава России

<sup>2</sup>НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России,

Научно-исследовательский институт детской онкологии и гематологии

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии

✉ ser-tsibulnikov@yandex.ru

### Аннотация

Несмотря на развитие лечения опухолей в последние годы, особых успехов в терапии метастатических и рекуррентных форм саркомы Юинга не наблюдается. Предложена новая схема терапии с использованием ингибиторов карбоангидраз, которая может дополнить классические методы лечения и улучшить прогноз выживаемости пациентов.

Саркома Юинга — это злокачественная опухоль костей и мягких тканей, которая в основном встречается у детей и подростков; примерно у 25 % пациентов при постановке диагноза обнаруживаются метастазы, которые часто устойчивы к интенсивной терапии. Несмотря на доказанную эффективность лечения локализованного заболевания, долгосрочная выживаемость пациентов с метастатической саркомой Юинга или рецидивом остается неприемлемо низкой.

Как известно, в ответ на традиционную противоопухолевую терапию в некоторых клетках происходят генетические изменения. В результате такие клетки становятся причиной повторного развития опухоли, которая резистентна к выбранному типу лечения. Такие резистентные опухоли представляют большую опасность для пациента, и поэтому поиск новых способов преодоления резистентности опухолевых клеток является актуальным направлением исследований.

В качестве дополнения к традиционной терапии мы предлагаем использовать комбинацию онколитического вируса, описанного ранее, и ингибитора карбоангидраз, которые играют важную роль в метаболизме опухоли. Так, карбоангидразы активно участвуют в контроле уровня pH внутри и вне клеток. В случае снижения pH в опухоли создаются благоприятные условия для метастазирования и инвазии, также это увеличивает экспрессию и активность матриксных металлопротеиназ и катепсина В. В случае повышения внутриклеточного pH подавляются апоптотические пути и контрольные точки клеточного цикла, что ускоряет прогрессию опухолевых клеток [1].

Для работы использовались следующие клеточные культуры саркомы Юинга: первичная линия опухолевых клеточных культур человека, выделенная из опухолевого материала в процессе резекции (ES36); перевиваемая линия клеток (A673); в качестве контроля использовались фибробласты человека (M19).

В рамках работы изучено воздействие ингибиторов карбоангидраз человека на клеточные линии в двумерных и трехмерных моделях. Также изучена экспрессия различных типов карбоангидраз в образцах тканей пациентов с диагнозом саркома Юинга.

Полученные данные позволяют продолжить развитие и исследование комбинированной терапии, которая позволит обойти недостатки классических подходов в терапии.

### Литература

1. Mboge M.Y., Mahon B.P., McKenna R., Frost S.C. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer // *Metabolites*. 2018. № 8. P. 19. <https://doi.org/10.3390/metabo8010019>

\* Данное исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда грант № 21-15-00213.

© С. В. Цибульников, Д. Р. Файзуллина, М. Ю. Степень, Д. А. Анискин, К. И. Киргизов, О. М. Романцова, С. А. Калинин, А. А. Недорубов, М. Ю. Красавин, П. С. Тимашев, И. В. Уласов, 2022



## МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ИЗ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ \*

И. А. Цыденова<sup>1,2</sup>, М. М. Цыганов<sup>1</sup>, М. К. Ибрагимова<sup>1,2</sup>,  
А. А. Нуштаева<sup>3</sup>, Н. В. Литвяков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

<sup>2</sup>Томский государственный университет

<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск

✉ tsydenova422@gmail.com

### Аннотация

Репликативное старение опухолевых клеток после проведения химиотерапии является известным феноменом, который заключается в том, что опухолевые клетки (как первичной опухоли, так и метастазов) перестают делиться, в них угнетается синтез РНК, и в этот период они либо восстанавливают свой пролиферативный потенциал, либо погибают.

### Введение

При раке молочной железы у 25 % больных опухолевые клетки после проведения неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) выходят из состояния репликативного старения и образуют метастазы. У больных раком молочной железы было показано, что выход из репликативного старения с метастазированием наблюдается только у тех пациентов, в опухоли которых эктопически активирован WNT-сигналинг за счет амплификаций генов активаторов и делеций негативных регуляторов этого сигнального пути. **Цель работы:** в прямом эксперименте на клеточных культурах, различающихся по эктопической активации WNT-сигналинга за счет CNA (Copy Number Aberration) генов WNT-сигналинга, изучить способность опухолевых клеток к выходу из репликативного старения после воздействия химиопрепаратов.

### Материалы и методы

В качестве химиопрепарата был использован цисплатин в дозе 25  $\mu$ M. Использовали две линии опухолевых клеток: T47D с высоким уровнем активации WNT-сигналинга (FZD9-Gain +1, TSF7L2-Loss +1, CCND1-Gain +1, CSNK2A2-Loss +1, FZD2-Gain +1, WNT3-Gain +1, WNT9B-Gain +1 в сумме 7) и линию Bt474 с нормальным уровнем WNT-сигналинга (GSK3B-Gain -1, FZD9-Gain +1, TSF7L2-Gain -1, CCND1-Gain +1, в сумме 0). Клетки культивировали в стандартных условиях на среде DMEM. Далее выделяли дифференцированные клеточные популяции CD44-/CD24+ с использованием сортера Sony SH800S (Sony Biotechnology, США) и при помощи IL6 индуцировали дедифференцировку до опухолевых стволовых клеток (ОСК). Для ингибирования WNT-сигналинга использовали ингибитор ICG-001 (1  $\mu$ M). Динамику роста культуры и формирование сфероидов (дедифференцировку до ОСК) фиксировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония) каждые 24 часа на протяжении 21 дня. Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS-Elements. Определяли клеточность культур, ареал закрытия дна лунки и наличие маммосфер. Полнотранскриптомный анализ осуществлялся на 21 сутки на платформе Clarium S Assay.

### Результаты

После воздействия цисплатина на субпопуляции EpCAM+CD44-CD24-/+ клеток опухолевых линий Bt474 и T47D динамика клеточности культур существенно различается. Клеточность Bt474 снижается на протяжении всего наблюдения, и на 21 сутки культивирования оказываются мертвыми практически все клетки. В то время как в контроле, без цисплатина, клеточность увеличивалась и образовывались ОСК, о чем свидетельствовало наличие сфероидов. Эти данные показывают, что клетки Bt474 с нормальным уровнем WNT-сигналинга не выходят из репликативного старения после воздействия цисплатина. Клетки линии T47D с эктопической активацией WNT-сигналинга после воздействия цисплатина выходили на 14-е сутки из репликативного старения, и к 21-м суткам клеточность культур существенно возросла и образовывались маммосферы. Совместное воздействие цисплатина и ингибитора приводит к тому, что на 21-е сутки практически все клетки этой линии погибали, в то время как один ингибитор не препятствовал пролиферации и образованию маммосфер. Действие ингибитора WNT ICG-001 подтверждалось транскриптомным анали-

\* Работа поддержана Грантом РФ № 21-15-00243.

зом, и экспрессия 122/170 генов WNT-сигналинга оказывается сниженной более чем в два раза по сравнению с клетками без воздействия ICG-001.

**Вывод**

Проведенные нами культуральные исследования механистически доказывают, что выход из репликативного старения опухолевых клеток обусловлен эктопической активацией WNT-сигналинга за счет амплификаций активаторов и/или делеций негативных регуляторов генов WNT-сигналинга.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ МЕДЬОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА *IN VIVO***С. А. Цымбал<sup>1</sup>, Ю. Г. Змитриченко<sup>2</sup>, А. А. Штиль<sup>3</sup><sup>1</sup>Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики<sup>2</sup>НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург<sup>3</sup>НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва

✉ zimbalscamt-itmo.ru

**Аннотация**

Лекарственная устойчивость является одним из факторов снижения эффективности химиотерапии опухолей. Для элиминации резистентных опухолей необходимо прибегать к подходам, нарушающим жизнеспособность опухолевых клеток в обход выработанных механизмов устойчивости. Соединения меди — перспективные кандидаты в лекарства, эффективность которых сравнима с производными платины. Мы изучили взаимодействие органических комплексов меди с N-ацетилцистеином (НАС), выявив значительное усиление их цитотоксического эффекта, вызванного генерацией активных форм кислорода (АФК). Возникновение окислительного стресса приводит к нарушению целостности плазматической мембраны и быстрой гибели опухолевых клеток, в том числе вариантов с фенотипом лекарственной устойчивости.

**Результаты**

Медьорганические комплексы синтезированы на Химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова. Цитотоксичность соединений в комбинации с НАС оценивали в МТТ-тестах. НАС приводил к значительному увеличению цитотоксичности медьорганических комплексов (рис. 1).

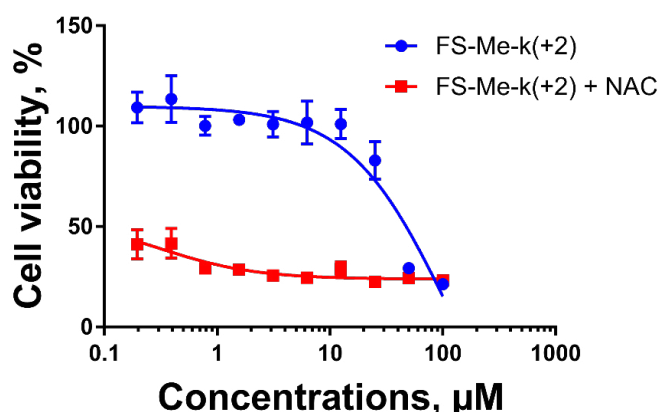


Рис. 1. Цитотоксичность органического комплекса меди в отсутствие и присутствии НАС

Клеточная смерть развивалась в первые 6–8 ч и отмечена для линий хронического миелоидного лейкоза K562, аденокарциномы кишки HCT116, тройного негативного рака молочной железы MDA-MB-231, аденокарциномы яичника SCOV-3 и других, в том числе для сублиний с лекарственной устойчивостью, например K562/4 (множественная лекарственная устойчивость). Проточная цитофлуориметрия и конфокальная микроскопия использовались для оценки индукции АФК и изменения морфологии и физиологии митохондрий, а также регистрации падения митохондриального потенциала. Механизм гибели был изучен с помощью окрашивания Аннексином V и пропидия иодидом, анализом клеточного цикла, иммуноблоттингом на каспазы и поли(АДФ-рибоза)-полимеразу (PARP). На основании полученных данных клеточная гибель протекает по механизму каспазозависимого апоптоза с нарушением целостности плазматической мембраны. Изучение молекулярных превращений в бесклеточной системе выявило высокую способность N-ацетилцистеина восстанавливать одно- и двухвалентную медь и нарушать проницаемость искусственных мембран. Масс-спектрометрический анализ выявил формирование цистеиновых димеров, соединенных дисульфидными связями, а также координирование восстановленных ионов меди в металлоорганических комплексах.

Первоначальные эксперименты показывают, что введение комбинации в брюшную полость мышей с привитой асцитной опухолью Эрлиха способно предотвращать прогрессию опухоли вплоть до её полного исчезновения (рис. 2). Дальнейшие испытания требуются для оценки статистической достоверности противоопухолевого эффекта.

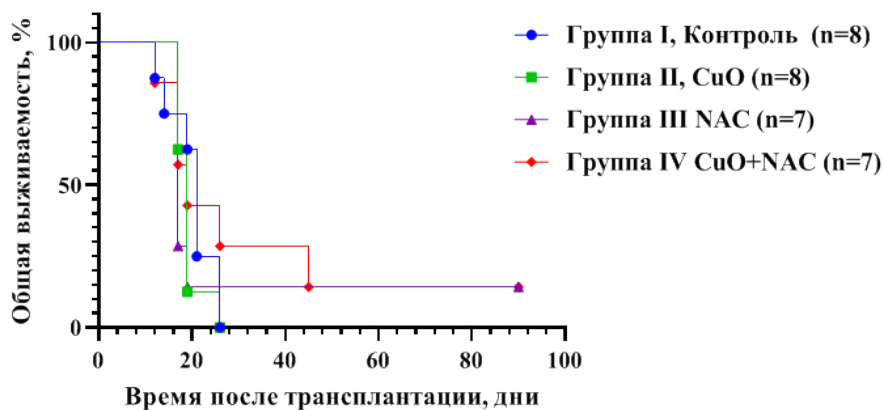


Рис. 2. Выживаемость мышей-самок BALB/c с трансплантированной карциномой Эрлиха после введения CuO, NAC и комбинации CuO+NAC

Таким образом, комбинации медьсодержащих соединений (наночастиц, органических комплексов, солей) и NAC высокоэффективны для опухолевых клеток различного гистогенеза, в том числе подтипы с приобретённой лекарственной устойчивостью. Генерация АФК приводит к множественным необратимым изменениям, сводящимся к повреждению плазматической мембраны и быстрой каспазозависимой гибели. Выявленные диапазоны переносимых доз у мышей позволят перейти к испытаниям на моделях полостных метастазов для определения эффективности комбинаций *in vivo*.

## ДОСТАВКА ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В КЛЕТКИ MCF-7 ПРИ ПОМОЩИ ЭКЗОСОМ МОЛОКА ЛОШАДИ\*

В. А. Черенко, С. Е. Седых, Г. А. Невинский

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

✉ v.cherenko@g.nsu.ru

### Аннотация

Экзосомы молока использовали для доставки цитостатических препаратов: доксорубицин, тамоксифен, доцетаксел и паклитаксел в культуры клеток MCF-7 с помощью экзосом молока лошади.

Экзосомы — это внеклеточные везикулы, секретируемые клетками, которые имеют диаметр 24–100 нм и выделены из различных жидкостей, в том числе молока. Целью настоящего исследования была оценка эффективности экзосом в качестве средств доставки и повышение эффективности лекарственного препарата в культурах опухолевых клеток. Для доставки были выбраны известные цитостатические препараты: доксорубицин, тамоксифен, доцетаксел и паклитаксел. Цитостатики доставляли в опухолевую клеточную линию MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека). После определения IC50 для каждого вещества для линии клеток MCF-7 данную концентрацию к клеткам добавляли в сочетании с препаратом экзосом в различных разведениях.

Препараты экзосом выделяли из молока лошади и дополнительно очищали гель-фильтрацией на Ultrogel A4. Конечная концентрация цитостатических препаратов (мкг/мл): доксорубицин — 5, тамоксифен — 6, доцетаксел — 5; паклитаксел — 6. Препараты экзосом смешивали с цитостатическими препаратами в разведениях 1 : 1000, 1 : 500, 1 : 100 и 1 : 50, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при перемешивании. Анализ цитотоксичности показал, что в сочетании с экзосомами молока цитостатические вещества снижают жизнеспособность клеток не менее чем на 50 % по сравнению с токсичностью самих препаратов. Результаты изменения относительной экспрессии генов-маркеров апоптоза (*bcl-2*, *BAX* и *p53*) показали, что повышение цитотоксичности препарата связано с изменением экспрессии генов апоптоза: добавление экзосом в комплексе с цитостатиками приводило к снижению экспрессии *bcl-2* и к повышению экспрессии генов *BAX* и *p53*, что соответствует литературным данным.

В дальнейшем препараты экзосом молока будут использованы для доставки направляющих РНК против генов-маркеров апоптоза. Полученные результаты могут быть актуальны в контексте использования экзосом молока для адресной доставки терапевтически значимых молекул в клетки и организмы модельных животных.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 18-74-10055.

© В. А. Черенко, С. Е. Седых, Г. А. Невинский, 2022

---

**SMALL HEAT SHOCK PROTEIN ALIBPA FROM MYCOPLASMA ACHOLEPLASMA LAIDLAWII PREVENTS THE FORMATION OF AMYLOID STRUCTURES IN THE BIOFILM MATRIX\***L. S. Chernova<sup>1,2</sup>, I. E. Vishnyakov<sup>2</sup>, A. R. Kayumov<sup>1</sup><sup>1</sup>*Institute of fundamental biology and medicine, Kazan Federal University, Kazan, Russia*<sup>2</sup>*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

✉ LSCh-888@live.com

**Abstract**

The fight against mycoplasmal infections is a problem, the solution of which is associated with the study of the molecular basis of the adaptation of mycoplasmas to environmental conditions. Heat shock proteins (HSP) are one of the key factors in bacterial adaptation to stress. HSPs disruption is associated with antimicrobial resistance and bacterial biofilm formation.

We investigated the ability of sHSP *AlIbpA* from *Acholeplasma laidlawii* to influence biofilm and amyloid formation. For this, *Escherichia coli* strains with deletions of native sHSPs ( $\Delta EcIbpA$ ,  $\Delta EcIbpB$ ) and *AlIbpA* overexpression were used. Crystal violet staining showed the amount of *AlIbpA* had no effect on bacterial biofilm density at 30 °C. Under heat shock (56 °C) *E. coli* cells formed denser biofilm, while hyperproduction of *AlIbpA* suppressed its formation *AlIbpA* also significantly reduced the amount of amyloid in the biofilm matrix. However, when colonies of the investigated strains were isolated on solid medium containing Congo Red dye, *E. coli*  $\Delta$ sHSP strains with hyperproduction of *AlIbpA* were characterized by a lower degree of Congo red staining than strains not expressing *AlIbpA*. Probably, sHSPs control amyloidogenic processes in the cells. Nevertheless, overexpression of *AlIbpA* can compensate for the lack of *E. coli* sHSPs significantly reducing the amounts of amyloids in the matrix.

---

\*This work was funded by RSF grant 22-24-01150.

© L. S. Chernova, I. E. Vishnyakov, A. R. Kayumov, 2022

**БЕЛОК VCL-2 СНИЖАЕТ ЧИСЛО АМИЛОИДНЫХ БЛЯШЕК  
В МОЗГЕ 5FAD МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА\***Д. П. Чернюк<sup>1</sup>, М. И. Полозова<sup>1</sup>, Г. Балтынк<sup>2</sup>, И. Б. Безпрозванный<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Лаборатория молекулярной нейродегенерации,

Санкт-Петербургский политехнический институт Петра Великого

<sup>2</sup>Лаборатория молекулярной и клеточной сигнализации, Католический университет Лёвена, Бельгия<sup>3</sup>Отделение физиологии, Юго-Западный медицинский центр штата Юта, Даллас, США

✉ dashachernuk@gmail.com

**Аннотация**

Известное своими антиапоптотическими свойствами семейство Vcl-2-белков обладает также возможностью связываться с IP3R1 и RyanR2. Эти рецепторы играют важную роль в регуляции Ca<sup>2+</sup>-сигнальных путей, которые нарушаются при патогенезе болезни Альцгеймера (БА). В данном исследовании проверена гипотеза о том, что экспрессия Vcl-2-белков может нормализовать кальциевый сигналинг в 5FAD мышшиной модели БА и тем самым предотвратить или замедлить развитие болезни.

Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний. Основным физиологическим признаком БА считается образование токсичных амилоидных бляшек в мозге [1, 2].

Патогенез БА заключается в нарушении регуляции сигнальных механизмов кальция (Ca<sup>2+</sup>) в нейронах, особенно усиленное высвобождение Ca<sup>2+</sup> из эндоплазматического ретикулума через инозитолтрифосфатные рецепторы первого типа (IP3R1) и риадиноновые рецепторы 2-го типа (RyanR2) [3, 4]. Наши предыдущие исследования показали, что экспрессия белков Vcl-2 ингибирует активность IP3R1 [5, 6]. В данном исследовании мы оценивали гипотезу о том, что экспрессия Vcl-2 способна нормализовать нейрональный кальций и оказать протекторное действие на 5FAD мышшиной модели БА. Для проверки этой гипотезы мы использовали аденоассоциированные вирусы (AAV) для экспрессии белков Vcl-2 в CA1 области гиппокампа 5FAD мышшиной модели БА на ранних стадиях ее развития. Для того чтобы оценить важность специфичной ассоциации с IP3R1, через AAV экспрессировалась также и мутантная форма Vcl-2K17D. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что мутация K17D нарушает ассоциацию домена BH4 Vcl2 с IP3R1 [7, 8]. При анализе конфокальных снимков, полученных со срезов 5FAD мышшей, выявлено, что наибольшая концентрация амилоидных бляшек в головном мозге находится в CA1-области гиппокампа и в зоне коры полушарий, находящейся медиально над CA1. В дальнейшем эти зоны анализировались во всех экспериментальных группах. Экспериментально мы обнаружили, что гиперэкспрессия белка Vcl-2 не снижает число амилоидных бляшек в мозге 5FAD ни в CA1-зоне гиппокампа, ни в коре. У мышшей 5FAD, инжектированных контрольным AAV-Cherry, в области CA1 гиппокампа и в коре значения процентной площади, занимаемой амилоидными бляшками, составляют 0,074 ± 0,007 % и 0,121 ± 0,020 % соответственно. У 5FAD мышшей с гиперэкспрессией Vcl-2 эти значения 0,077 ± 0,010 % и 0,097 ± 0,013 % соответственно. Зато после инжектирования вирусом, кодирующим мутантную форму Vcl-2K17D, в обеих исследуемых зонах произошло значительное сокращение числа амилоидных бляшек до 0,028 ± 0,07 % в -ласти гиппокампа и до 0,049 ± 0,009 % в коре. Из полученных данных можно сделать вывод, что гиперэкспрессия нативного белка Vcl-2 не обладает амилоидпротекторными свойствами в отличие от его мутантной формы Vcl-2K17D.

Таким образом, протекторный эффект не опосредован ассоциацией Vcl-2 с InsP3R1. Возможные механизмы действия Vcl-2 могут быть связаны с его способностью ингибировать активность RyanR2, так как наши предыдущие исследования показали, что ассоциация с RyanR2 не нарушается при мутации K17D [9]. Также возможно, что Vcl-2 оказывает нейропротекторное действие через пути, не связанные с модуляцией передачи сигналов Ca<sup>2+</sup>, например, благодаря его известным антиапоптотическим свойствам [10]. Для понимания механизмов, ответственных за нейропротекторное действие белков Vcl-2 в моделях БА необходимы дальнейшие исследования.

**Литература**

1. Nussbaum R. L., Ellis C. E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease // N. Engl. J. Med. 2003. № 348. P. 1356–1364.
2. Hardy J. A., Higgins G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis // Science. 1992. № 256(5054). P. 184–185.
3. Toescu E. C., Verkhratsky A. Role of calcium in normal aging and neurodegeneration // Aging Cell. 2007. № 6(3). P. 265.

\* Работа поддержана РФФ № 20-45-01004.

© Д. П. Чернюк, М. И. Полозова, Г. Балтынк, И. Б. Безпрозванный, 2022

4. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases // *Trends Mol. Med.* 2009. № 15(3). P. 89–100.
5. Szabadkai G., Bianchi K., Varnai P. et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels // *J. Cell. Biol.* 2006. № 175(6). P. 901–911.
6. Rong Y. P., Aromolaran A. S., Bultynck G. et al. Targeting Bcl-2-IP<sub>3</sub> receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals // *Mol. Cell.* 2008. № 31(2). P. 255–265.
7. Bootman M. D., Bultynck G. *Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer* // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2020. № 12(1).
8. Rong Y. P., Bultynck G., Aromolaran A. S. et al. The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP<sub>3</sub> receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. № 106(34). P. 14397–14402.
9. Vervliet T., Decrock E., Molgo J. et al. Bcl-2 binds to and inhibits ryanodine receptors // *J. Cell. Sci.* 2014. № 127(Pt 12). P. 2782–2792.
10. Tait S. W., Green D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. № 11(9). P. 621–632.



**ФОРМИРОВАНИЕ КОНТАКТОВ МЕЖДУ КЛАСТЕРАМИ БЕЛКА Bcl2 И КЛАСТЕРАМИ РЕЦЕПТОРА IP3 В МЫШИНЫХ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ *IN VIVO***\*М. Е. Чигряй<sup>1</sup>, А. В. Раковская<sup>1</sup>, Е. И. Пчицкая<sup>1</sup>, И. Б. Безпрозванный<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Лаборатория молекулярной нейродегенерации,

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

<sup>2</sup>Юго-Западный медицинский центр университета Техаса, Даллас, США

✉ margarita075@gmail.com

**Аннотация**

Исследования показали, что про- и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 являются важными модуляторами динамики внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Антиапоптотический Bcl-2 ингибирует высвобождение Ca<sup>2+</sup> из эндоплазматического ретикулума (ER) путем прямого связывания и ингибирования инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (IP3Rs) и внутриклеточного канала высвобождения Ca<sup>2+</sup>. Связывание Bcl-2 с IP3R подавляет проапоптотическую передачу сигналов Ca<sup>2+</sup> [1], указывая на то, что комплекс Bcl-2-IP3R является потенциальной терапевтической мишенью для заболеваний, связанных с устойчивостью к гибели клеток из-за Bcl-2, таких как некоторые виды рака. Домен BH4 белка Bcl-2 необходим и достаточен для связывания и ингибирования IP3R. Мутация K17 D (с образованием белка Bcl-2K17D) ослабляет способность Bcl-2 сильно связывать и ингибировать каналы IP3R. В текущих экспериментах мы намеревались оценить совместную локализацию Bcl-2 и IP3R в нейронах диких мышей и мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера (5xFAD). Было обнаружено, что оба белка находятся в соме нейронов, преимущественно в виде кластеров, которые характеризуются низким уровнем совместной локализации как в нейронах гиппокампа дикого типа, так и в линии 5xFAD. Применение метода экспансионной микроскопии [2] позволило показать, что некоторые кластеры Bcl-2 находятся в контакте с кластерами IP3R1. На основании полученных данных было высказано предположение, что эти белки расположены в разных клеточных органеллах, IP3R1 — в ЭР, а Bcl-2 — в митохондриях, где он кластеризуется в местах контакта с ЭР, в так называемых митохондриально-ассоциированных мембранах (МАМ). Обнаружено, что белок mCherry-Bcl2-K17D, у которого нарушено связывание IP3R, также как и mCherry-Bcl-2, образует кластеры в соме нейронов гиппокампа.

**Литература**

1. Vervliet T. et al. Ryanodine receptors are targeted by anti-apoptotic Bcl- XL involving its BH4 domain and Lys87 from its BH3 domain // Scientific Reports. 2015.
2. Деревцова К.З. и др. Применение метода экспансионной микроскопии в нейробиологии // Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2021. Т. 107. № 4-5. С. 568-583.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-45-01004.

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕКОМБИНАНТНОЙ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-COV-2\***В. Ю. Чиркова<sup>1</sup>, Е. А. Шарлаева<sup>1</sup>, С. В. Беленькая<sup>1,2</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ varvara.chirkova@gmail.com

**Аннотация**

Определены кинетические параметры (предельная скорость реакции, константа Михаэлиса, число оборотов и каталитическая эффективность) рекомбинантной основной коронавирусной протеазы 3CLpro, используемой при оценке ингибирующей активности соединений.

Одним из основных подходов к разработке противовирусных препаратов в условиях глобальной пандемии COVID-19 является поиск эффективных ингибиторов основной коронавирусной протеазы 3CLpro, которая вместе с папаин-подобной протеазой катализирует реакцию протеолиза вирусного пролипротеина с образованием неструктурных белков, способных собираться в репликативно-транскрипционный комплекс, участвующий в синтезе РНК вируса SARS-CoV-2.

В исследованиях по оценке ингибирующей активности природных и синтетических соединений использовали рекомбинантную основную протеазу 3CL. Для характеристики любых ферментов важно определение основных параметров кинетики Михаэлиса–Ментен: предельной скорости ферментативной реакции ( $V_{max}$ ), константы Михаэлиса ( $K_m$ ), числа оборотов фермента ( $k_{cat}$ ), каталитической эффективности или константы специфичности ( $k_{cat}/K_m$ ). Целью настоящего исследования являлось определение кинетических параметров рекомбинантной протеазы 3CLpro.

Ранее нашим коллективом была разработана рекомбинантная плаزمиды, обеспечивающая, при трансформации клеток *E. coli*, синтез растворимой 3CLpro SARS-CoV-2. Для подтверждения идентичности полученного фермента в работе измеряли полуингибирующую концентрацию ряд известных ингибиторов главной протеазы SARS-CoV-2, дисульфирама ( $IC_{50} = 6,25 \pm 1,97$  мкМ), ML188 ( $IC_{50} = 1,56 \pm 0,55$  мкМ) и GC376 ( $IC_{50} = 2,34 \pm 0,39$  нМ) полученные результаты согласуются с данными литературы [1].

Предельная скорость ферментативной реакции и константа Михаэлиса определяли с использованием пептидного субстрата с флуоресцентной меткой, включающей сайт протеолиза главной протеазы 3CL, на планшетном флуориметре ClarioSTAR Plus. Согласно полученным данным  $V_{max}$  реакции составила  $122,38 \pm 3,59$  мМ/с, среднее значение  $K_m$  —  $19,33 \pm 1,61$  мкМ. На основе полученных данных были рассчитаны число оборотов ( $1,1 \pm 0,1$  с<sup>-1</sup>) и каталитическая эффективность фермента ( $0,07 \pm 0,01$  мкМ<sup>-1</sup> с<sup>-1</sup>). Полученные значения указывают на высокую специфическую активность исследуемого фермента.

**Литература**

1. Vandyck K., Deval J. Considerations for the discovery and development of 3-chymotrypsin-like cysteine protease inhibitors targeting SARS-CoV-2 infection // *Current Opinion in Virology*. 2021. V. 49. P. 36–40.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы.

© В. Ю. Чиркова, Е. А. Шарлаева, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков, 2022

## ПОИСК И ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОРА CTLA-4Fc С ПЕПТИДОМ-БЛОКАТОРОМ\*

Д. В. Шаньшин<sup>1</sup>, С. В. Подлесных<sup>2</sup>, Е. А. Колосова<sup>1</sup>, Е. Д. Гаськова<sup>2</sup>, А. А. Шелемба<sup>3</sup>, А. И. Шаповал<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Российско-американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, Барнаул

<sup>3</sup>Лаборатория особо опасных вирусных инфекций, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

✉ dan6091154224@gmail.com

### Аннотация

Взаимодействие лигандов В7-1/В7-2 с рецепторами CD28/CTLA-4 играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа. В ходе работы при помощи микрочипов нового поколения было отобрано восемь пептидов, показавших максимальную интенсивность флуоресценции при взаимодействии с CTLA-4Fc. Взаимодействие синтезированных пептидов с белком CTLA-4Fc было подтверждено при помощи ИФА и биослойной интерферометрии.

В7 — важная корегуляторная молекула, которая экспрессируется на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК) человека; представлена двумя формами: В7-1 и В7-2. Рецепторы лигандов В7 на поверхности Т-клеток — молекулы CD28/CTLA-4. Взаимодействие В7-1 или В7-2 с CD28 способствует активации Т-клеток, пролиферации и секреции цитокинов. Взаимодействие В7-1 или В7-2 с CTLA-4 снижает активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов [1]. Блокада костимуляторных путей регуляции иммунного ответа может обеспечить эффективную терапию аутоиммунных заболеваний и предотвратить отторжение трансплантатов. Роль блокаторов могут выполнять пептиды, характеризующиеся высокой специфичностью взаимодействия с мишенью и низкой молекулярной массой, что может снижать количество побочных эффектов [2].

В работе при помощи пептидных микрочипов проведен отбор пептидов, связывающихся с CTLA-4. Для этого использовали рекомбинантный химерный белок, содержащий внеклеточный домен молекулы CTLA-4, и Fc-домен иммуноглобулина класса 1 человека (hIgG1). Выявлены 350 пептидов, которые специфически взаимодействуют с CTLA-4Fc. Для дальнейшего анализа из них были синтезированы восемь пептидов, показавших максимальную интенсивность флуоресценции при взаимодействии с CTLA-4Fc. При помощи иммуноферментного анализа было выявлено, что четыре пептида — р339, р344, р345, р346 — показали наибольший сигнал взаимодействия; пептид р344 был выбран для дальнейшего анализа.

При помощи компьютерного моделирования построена модель комплекса пептида р344 с CTLA-4. Положение пептида р344 на молекуле CTLA-4 является энергетически оптимальным вблизи петли 99MYPPPY104. Известно, что петля 99MYPPPY104 CTLA-4 отвечает за связывание CTLA-4 с В7-1.

Для подтверждения взаимодействия изучали кинетики связывания пептида р344 с CTLA-4Fc с помощью прибора Octet K2. Полученные результаты Kd для CTLA-4Fc с р344 ( $8 \times 10^{-10}$ ) и CTLA-4Fc с В7-1 ( $5 \times 10^{-10}$ ), сопоставимые между собой, что указывает на высокое сродство отобранного пептида к белку CTLA.

Таким образом, в ходе данной работы выявлены пептиды, взаимодействующие с молекулой CTLA-4. Экспериментальные данные, полученные с помощью ИФА и кинетики взаимодействия, экспериментально подтверждают сродство р344 пептида к молекуле CTLA-4.

### Литература

1. Шаповал А. И. и др. Молекулы контроля иммунитета семейства В7. Часть 1. Общая характеристика и первые представители: В7-1, В7-2, В7-Н1, В7-Н2 и В7-DC // Биоорганическая химия. 2019. Т. 45. № 4. С. 348–364.
2. Titov M. I. Medical preparations based on synthetic peptides // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Физика и химия. 2013. № 4. С. 86–102.

\* Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № FZMW-2020-0007).

**КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПА ШИРОКОРЕАКТИВНОГО АНТИТЕЛА 10Н10\***Д. В. Шаньшин<sup>1</sup>, С. С. Борисевич<sup>2,3</sup>, Е. В. Протопопова<sup>1</sup>, В. Б. Локтев<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1</sup><sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово<sup>2</sup>Лаборатория физической химии Уфимского института химии УФСО РАН<sup>3</sup>Российско-американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, Барнаул

✉ dan6091154224@gmail.com

**Аннотация**

Исследование посвящено картированию антитела 10Н10, способного реагировать с поверхностным гликопротеином широкого спектра флавивирусов. При помощи иммунохимических методов и фаговой пептидной библиотеки локализован регион взаимодействия 10Н10 с оболочечным белком (Е) вируса клещевого энцефалита. Проведено моделирование комплекса антитела с белком Е вируса клещевого энцефалита и Зика.

В последние годы отмечается постоянный рост заболеваемости, обусловленной представителями семейства *Flaviviridae* [1, 2]. Семейство *Flaviviridae* представлено четырьмя родами, включающими 89 известных видов вирусов. Все вирусы семейства *Flaviviridae* имеют общую структуру генома и аминокислотную гомологию основных структурных белков [3, 4]. В ряде случаев для терапии флавивирусной инфекции можно использовать моноклональные антитела (мАт). В настоящее время доступно несколько моноклональных антител (нАт), нейтрализующих флавивирусы [4]. Мишенью нейтрализующих антител чаще всего является белок Е [5]. Белок Е участвует в связывании вирусных частиц с клеточными рецепторами, которые опосредуют проникновение вирусов в клетки-хозяева. Эта особенность делает белок Е привлекательной мишенью для разработки нАт.

Целью данной работы было картирование эпитопа мАт 10Н10.

Для картирования области полипротеина флавивируса, распознаваемой 10Н10, были сконструированы рекомбинантные белки, включающие различные домены белка Е (TEF1, TEF2 и TEF3) и белка NS1 (TNS1) ВКЭ, а также фрагменты 1-180 а.о. вирусов ZIKV, DENV и WNV. В результате было показано что антитело связывает белки TEF1, WEF1, ZEF1 и DEF1, но не связывает TEF2, TEF3 или TNS1. Это свидетельствует о том, что сайт, распознаваемый 10Н10, расположен между 86 и 126 а.о. белка Е.

Выравнивание аминокислотных последовательностей Е белка флавивирусов показывает, что петля слияния является наиболее консервативным регионом у разных флавивирусов. Поэтому мы предположили, что область 98-DRGWGNGCGLFGKGS-113 Е-белка является мишенью для антитела 10Н10. Для проверки этой гипотезы мы создали 3D-модель связывающей части антитела 10Н10 с участком петли слияния (а.о. 98-113) белка Е вируса Зика и клещевого энцефалита. Моделирование показало принципиальную возможность образования подобного комплекса.

Для подтверждения результатов моделирования провели раунды аффинной селекции из фаговой пептидной библиотеки с использованием в качестве мишени мАт 10Н10. В результате были отобраны пептиды, аминокислотная последовательность наиболее представленного из отобранных пептидов, GYAGWGNSWGLF, обладает высоким сходством с регионом петли слияния, 98-113 белка Е флавивирусов, что подтвердило высказанную гипотезу.

В результате проделанной работы было определен эпитоп в составе поверхностного белка флавивирусов, с которым взаимодействует мАт 10Н10.

**Литература**

1. Sigfrid L., Reusken C., Eckerle I. et al. Preparing clinicians for ( re- ) emerging arbovirus infectious diseases in Europe // Clin. Microbiol. Infect [Internet]. 2018. № 24(3). P. 229–239. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.029>
2. Morens D.M., Santos J.I., Horstick O. Emerging and Reemerging Aedes -Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas // Implications for Health Policy. 2019. № 109(3). P. 387–393.
3. Neufeldt C.J., Cortese M., Acosta E.G., Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family // Nat. Publ. Gr. [Internet]. 2018. № 16(3). P. 125–142. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
4. Begum F., Das S., Mukherjee D., Mal S. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. 2019.
5. Kotaki T., Kurosu T., Grinyo-Escuer A. et al. An affinity-matured human monoclonal antibody targeting fusion loop epitope of dengue virus with in vivo therapeutic potency // Sci. Rep. 2021. № 11(1). P. 1–14.

\* Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

## ПОИСК СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЛОКАТОРОВ РЕЦЕПТОРА СТЛА-4 Т-ЛИМФОЦИТОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АФФИННОСТИ \*

О. Н. Шапрова<sup>1,2</sup>, Д. В. Шаньшин<sup>1,2</sup>, А. А. Шелемба<sup>3</sup>, А. И. Шаповал<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Российско-Американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, Барнаул

<sup>3</sup>Лаборатория особо опасных вирусных инфекций,

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

✉ ngelya209@gmail.com

### Аннотация

Несмотря на продолжительную борьбу ученого сообщества, онкологические заболевания и по сей день являются серьезной проблемой для человечества. Наиболее перспективными и безопасными сейчас выглядят разработки методов лечения, связанных с блокированием рецепторов Т-лимфоцитов, таких как СТЛА-4.

Большинство опухолей неиммунногенны ввиду механизмов снижения презентации опухолеспецифических антигенов на их поверхности. При исследовании лимфоцитов периферической крови больных с подавленными иммунными реакциями было выявлено, что лимфоциты, инфильтрующие опухоль, в некоторых случаях были анергичными [1]. Одной из причин подавления цитотоксического иммунного ответа является гиперэкспрессия лиганда В7-2, который взаимодействует с поверхностным рецептором Т-лимфоцитов СТЛА-4 (CD152). Их взаимодействие позволяет опухолевым клеткам инактивировать Т-лимфоциты и тем самым избежать иммунного ответа [2]. Поиск блокаторов взаимодействия В7-2 и СТЛА-4 является актуальной задачей и может помочь при создании препаратов для терапии рака. Целью данной работы был поиск пептидов, способных за счет специфического взаимодействия блокировать молекулу СТЛА-4.

Поиск специфических блокаторов рецептора СТЛА-4 проводили при помощи аффинной селекции из фаговой пептидной библиотеки. В работе использовали 12-мерную пептидную библиотеку M13 (NEB). Для селекции использовали магнитные частицы, содержащие белок А, в то время как мишень, рекомбинантный белок СТЛА-4, содержал Fc-фрагмент человеческого антитела IgG. В процедуру также включили этап негативной селекции для снижения вероятности отбора неспецифических фагов [3].

После трех раундов, позволивших обогатить библиотеку специфическими пептидами, были взяты 60 фаговых клонов для анализа нуклеотидных последовательностей, кодирующих чужеродный пептид. Выявлено наличие уникальных пептидов (не представлены в базе PepBank).

Анализ аминокислотных последовательностей пептидов позволил выделить две группы пептидов. Первая группа не имела общего мотива. При сравнении последовательностей 12-мерных пептидов был обнаружен консенсусный мотив, который является общим для второй группы выбранных бактериофагов.

Специфичность связывания полученных бактериофагов с белком СТЛА-4 подтверждали с помощью дот-блот анализа. В эксперименте анализировали клоны, представляющие две группы фаготопов, а также бактериофаг без пептидной вставки. На нитроцеллюлозную мембрану наносили суспензию каждого бактериофага с биологическим титром  $10^9$  БОЕ/мл. Иммунохимический анализ показал, что бактериофаги, содержащие мотив пептидов второй группы, специфически взаимодействуют с рекомбинантным аналогом рецептора лимфоцитов СТЛА-4. Два пептида были синтезированы для дальнейшего исследования.

Для подтверждения взаимодействия определяли кинетику связывания синтезированных пептидов с СТЛА-4 с помощью прибора Octet K2. Получены значения Kd для трех пар: СТЛА-4Fc с синтетическими пептидами 201 ( $5,21 \cdot 10^9$ ) и 202 ( $8,44 \cdot 10^5$ ), и СТЛА-4Fc с В7-1 ( $5,08 \cdot 10^{10}$ ).

Таким образом, в ходе работы из фаговой библиотеки были отобраны пептиды, специфически взаимодействующие с СТЛА-4. При помощи метода бислойной интерферометрии показано высокое сродство пептида 201 к СТЛА-4.

### Литература

1. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. Мейл. М.: Мир, 2000. 592 с.
2. Schreiber R. D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth // Science. 2011. Vol. 331(6024). P. 1565–1570.
3. Derda R. Diversity of Phage-Displayed Libraries of Peptides during Panning and Amplification / R. Derda, Sindy K. Y. Tang, S. Cory Li et al. // Molecules. 2011. № 16. P. 1776–1803.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки РФ (№ FZMW-2020-0007).

© О. Н. Шапрова, Д. В. Шаньшин, А. А. Шелемба, А. И. Шаповал, 2022

## СПОСОБ ОЧИСТКИ мРНК ОТ ПРИМЕСЕЙ дцРНК\*

С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ sharabrin.sv@gmail.com

### Аннотация

Матричная РНК является новой и потенциально крайне эффективной вакцинной платформой. Однако в технологическом плане остался еще ряд проблем, и одна из них связана с тем, что в процессе синтеза мРНК *in vitro* образуются побочные продукты — примеси двуцепочечной РНК (дцРНК). Примеси дцРНК при попадании в организм вызывают активацию врожденного иммунитета, что ускоряет разрушение целевой мРНК-вакцины. В данной работе представлен способ очистки мРНК от примесей дцРНК с помощью целлюлозы.

В последние годы мРНК, синтезируемая *in vitro*, вызвала огромный интерес в области разработки вакцин. Однако во время инициации транскрипции образуются побочные продукты РНК длиной от 5 до 11 нуклеотидов, поскольку фермент может случайно прерывать синтез РНК. Кроме того, Т7-РНК-полимераза инициировать синтез комплементарной РНК из первичных транскриптов, что приводит к образованию примесей двуцепочечной РНК (дцРНК). Клетки определяют чужеродную дцРНК через ряд рецепторов, например Toll-подобного рецептора 3 (TLR3), индуцируемого ретиноевой кислотой гена I (RIG-I), и др. Это приводит к активации врожденного иммунитета, что вызывает секрецию различных цитокинов, таких как интерфероны, интерлейкины и др. Различными механизмами они приводят к ингибированию синтеза белка в клетках и ускоренному распаду мРНК. Удаление дцРНК из синтезированной мРНК имеет решающее значение для улучшения трансляции вводимой мРНК и ограничения индукции цитокинов. Для очистки мРНК от примесей дцРНК часто используют высокоэффективную жидкостную хроматографию с обращенной фазой (ВЭЖХ) с ионными парами, однако этот метод является трудоёмким и дорогостоящим.

Целью данной работы являлась разработка метода очистки мРНК от примесей дцРНК с использованием целлюлозы.

Чтобы оценить возможность применения целлюлозы для удаления примесей дцРНК из синтезированной РНК, была получена мРНК-GFP длиной около 1000 нуклеотидов. Синтез мРНК, кодирующей GFP, проводился с соответствующей матрицы — плазмидной ДНК, несущей ген GFP под контролем промотора фага Т7. Для получения мРНК использовался набор T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CELLSCRIPT) согласно протоколу производителя.

Удаление примесей дцРНК проводили с использованием целлюлозных волокон (C6288, Sigma-Aldrich) и хроматографического буфера. РНК добавляли в раствор целлюлозы и инкубировали в течении 30 минут при комнатной температуре на шейкере. Затем очищенную РНК центрифугировали для отделения целлюлозы, содержащей дцРНК, аккуратно отбирали супернатант и переосаждали в спирте для выделения чистой одноцепочечной РНК.

Эффективность очистки оценивали с помощью дот-блотта с использованием моноклональных антител к дцРНК (Jena Bioscience) и иммунизации лабораторных мышей мРНК-GFP методом электропорации с последующей микроскопией мышечных тканей. Дот-блот-анализ, проведенный с антителом, специфичным к дцРНК, показал, что фракция очищенной мРНК практически не содержала дцРНК по сравнению с исходной мРНК. Это подтверждает эффективное удаление загрязняющих веществ дцРНК целлюлозой за счёт сорбции дцРНК на целлюлозный материал во время процесса очистки. Иммунизация животных мРНК-GFP показала, что очищенная мРНК обеспечивает более значительное свечение GFP в мышечной ткани, чем неочищенная мРНК. Это свидетельствует о более эффективном синтезе белка с очищенной мРНК.

Таким образом, нами предложен метод очистки мРНК от дцРНК, который повышает эффективность трансляции белка с мРНК и тем самым будет обеспечивать более высокий иммунный ответ.

\* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.  
© С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв, 2022

**WATER-SOLUBLE POLYOL-METHANOFULLERENE REDUCES EXCESSIVE NEUTROPHILS-INDUCED ROS IN THE HUMAN BLOOD *EX VIVO* \***G. R. Sharapova<sup>1</sup>, G. R. Tarasova<sup>1</sup>, G. M. Fazleeva<sup>2</sup>, L. N. Islamova<sup>2</sup>, N. V. Kalacheva<sup>1</sup><sup>1</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University*<sup>2</sup>*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center*

✉ gulnazs291@gmail.com

**Abstract**

We have demonstrated for the first time that the water-soluble polyol-methanofullerene, which is a mild uncoupler of OXPHOS, retains the antiradical properties of native fullerene C<sub>60</sub> and reduces the excess of ROS generated by activated neutrophils in human blood *ex vivo*.

Neutrophils are one of the first immune cells that are recruited to inflammatory sites, providing a first line of immune defense against pathogens. With the development of an inflammatory reaction, the production of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils increases. Under normal conditions excess ROS is counterbalanced by an increase in antioxidant protection. Under impaired redox balance the production of ROS is not properly controlled, which leads to a severe tissue damage. In this regard, antioxidants may have beneficial effects in patients with inflammatory diseases, including severe pneumonia. For the first time, we studied the ability of water-soluble polyol-methanofullerene C<sub>60</sub>[C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>(OH)<sub>4</sub>]<sub>6</sub> to reduce the excessive level of ROS produced by activated neutrophils. Polyol-methanofullerene is mild protonophore uncoupler of OXPHOS [1] and preserves antiradical properties of fullerene C<sub>60</sub>. In the reaction of formation of the superoxide radical with NADH/phenazine methosulfate, polyolmethanofullerene reduces the level of superoxide anions. The main source of ROS in neutrophils is membrane-bound NADH oxidases (NOXs) but mitochondria are also important for their functioning [2], so we measured the mitochondrial potential ΔΨ<sub>m</sub> (JC-1 fluorochrome) along with ROS (CellROX<sup>®</sup> Deep Red dye). The neutrophils were activated by the addition of bacteria *Ser. marcescens* to the whole blood of healthy volunteer donors. Activation of neutrophils by *Ser. marcescens* was accompanied by an increase of ΔΨ<sub>m</sub> in them and by an increase of their generation of ROS. Polyol-methanofullerene reduced ΔΨ<sub>m</sub> and the excess of ROS produced by neutrophils to the initial values (non-activated cells) in the concentrations 80 μM and 120 μM. In doing so, the cell viability (propidium iodide test) was not changed.

The results obtained justify further study of polyolmethanofullerene C<sub>60</sub>[C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>(OH)<sub>4</sub>]<sub>6</sub> as a promising antioxidant in severe forms of infections, including pneumonia.

**References**

1. Kalacheva N.V. et al. Water-soluble polyol-methanofullerenes as mitochondria-targeted antioxidants: Mechanism of action // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28(6). P. 1097–1100.
2. Vorobjeva N.V. et al. Targeting Mitochondria in Neutrophilic Inflammation // *Frontiers in Pharmacology.* 2021. V. 12.

## АНАЛИЗ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К S-БЕЛКУ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ДОНОРОВ\*

Л. Ш. Шаяхметова<sup>1,2</sup>, А. М. Тимофеева<sup>1</sup>, С. Е. Седых<sup>1,2</sup>, Г. А. Невинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ l.shayakhmetova@g.nsu.ru

### Аннотация

Антитела к S-белку и к его домену RBD образуются после перенесенного COVID-19 или вакцинации. В данной работе из плазмы крови доноров, переболевших COVID-19 и/или вакцинированных Sputnik V, выделены препараты IgG. Получены фракции RBD-IgG и S-IgG, проведен скрининг активности IgG, RBD-IgG и S-IgG в гидролизе RBD.

При ряде вирусных инфекций (клещевой энцефалит, ВИЧ-инфекция) обнаружены каталитически активные антитела, гидролизующие ДНК, олигонуклеотиды, белки и пептиды. Антитела к S-белку, в частности RBD-антитела, вызывают особый интерес в изучении гуморального ответа на SARS-CoV-2, так как RBD отвечает за вход в клетку-хозяина в результате связывания с ACE2-рецептором. Антитела, связывающие RBD, ингибируют взаимодействие S-белка с ACE2. Цель данной работы заключалась в исследовании протеолитической активности антител, образующихся у доноров, переболевших COVID-19 и вакцинированных Sputnik V.

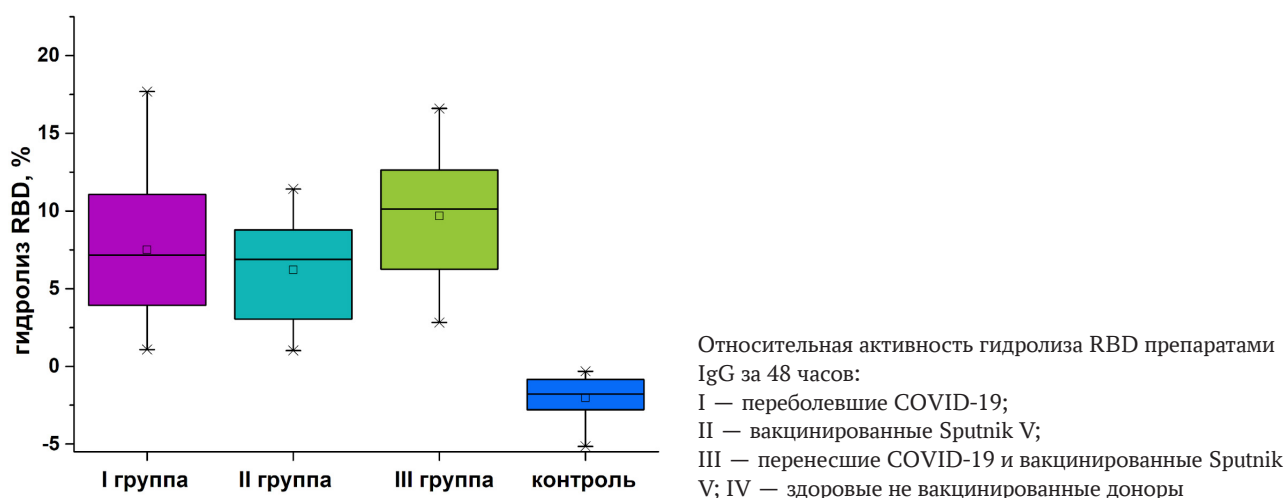
На основании анкетных данных были отобраны образцы плазмы крови добровольцев, которые были определены в четыре группы:

- группа I: переболевшие COVID-19 в 2020–2021 году, не вакцинированные;
- группа II: вакцинированные Спутником V в начале 2021 года;
- группа III: переболевшие COVID-19 в 2020–2021 году и вакцинированные в начале 2021 года препаратом Спутник V;

группа IV: не вакцинированные доноры, не переболевшие COVID-19.

Образцы крови были собраны во время первой волны вируса (вариант Wuhan). В исследовании были отобраны доноры, не имеющие аутоиммунных патологий и хронических инфекций. Наличие или отсутствие перенесенного COVID-19 в анамнезе подтверждали иммуноферментным анализом антител к S- и N-белкам.

Аффинной хроматографией на Protein-G-Sepharose выделены препараты IgG каждой группы доноров, показана электрофоретическая гомогенность полученных препаратов IgG. Проанализированы препараты IgG крови 32 доноров из числа доноров I, II, III, IV групп (см. рисунок). Показано, что относительная активность гидролиза RBD препаратами IgG пациентов, перенесших COVID-19, варьирует в диапазоне 2–11 %. Активность гидролиза препаратов IgG вакцинированных Sputnik V доноров находится в пределах 4–18 %, препараты IgG III группы доноров гидролизуют RBD с эффективностью 3–17 %.



\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-75-10105.



Анализ зависимости протеолитической активности препаратов IgG пяти доноров от экзогенных ионов различных двухвалентных металлов показал, что  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  увеличивают активность гидролиза RBD препарата IgG донора ID 1171. Добавление ионов двухвалентных металлов к препаратам IgG остальных доноров не оказывает значительного эффекта на активность гидролиза.

Суммарный препарат IgG от 20 доноров каждой из групп подвергали аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованным RBD-белком SARS-CoV-2. Анализ профиля хроматографии показал, что содержание RBD-IgG в плазме крови доноров в среднем составляет 1,1–1,2 % от всех IgG. Препараты IgG, не связавшиеся с RBD-сефарозой, наносили на колонку с иммобилизованным S-белком. Отобраны антитела, обладающие сродством к другим доменам S-белка. Количество S-IgG-антител в образцах в среднем составило 0,6–1,3 % от всех IgG. Скрининг активности RBD-IgG и S-IgG в гидролизе рекомбинантного RBD-белка SARS-CoV-2 показал, что суммарные препараты RBD-IgG, полученные от переболевших COVID-19 пациентов, наиболее активно гидролизуют RBD (активность гидролиза — 14 %).

Таким образом, RBD-IgG пациентов, переболевших COVID-19, гидролизуют RBD с большей эффективностью, чем препараты пациентов II и III групп. Активность гидролиза RBD препаратами IgG плазмы крови доноров I–III групп в большей степени зависела от индивидуальных особенностей доноров, чем от вакцинации или перенесенного COVID-19.

## СОЗДАНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ АФФИННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВАРИАНТОВ SPIKE-БЕЛКА SARS-COV-2 С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ \*

Д. С. Шершнева<sup>1,2</sup>, Т. Н. Беловежец<sup>1</sup>, С. В. Кулемзин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ dashashershneva49@gmail.com

### Аннотация

Поиск и характеристика антител, нейтрализующих все варианты SARS-CoV-2, продолжает оставаться актуальной задачей. Для ее решения разработан универсальный подход, основанный на измерении связывания исследуемых антител с баркодированными клетками человека, экспрессирующими различные варианты Spike-белка SARS-CoV-2, позволяющий быстро оценивать аффинность таких взаимодействий и приоритезировать лидирующие антительные кандидаты.

Несмотря на разработку и одобрение новых видов терапии SARS-CoV-2, расширение репертуара противовирусных агентов на основе антител продолжает оставаться востребованным, поскольку существуют незащищенные категории людей, которые либо не могут быть вакцинированы по медицинским показаниям, либо не способны формировать адекватные иммунные ответы. При этом, в связи с высокими темпами изменчивости SARS-CoV-2 наблюдается выраженное снижение активности уже одобренных для применения в клинике нейтрализующих моноклональных антител, полученных против исходного варианта вируса, что стимулирует разработку новых широко нейтрализующих антител, устойчивых к антигенному дрейфу. Создание таких антител обычно связано с проведением масштабных и затратных скринингов кандидатов для их характеристики. Чтобы решить проблему измерения аффинности антител к S-белку (Spike) SARS-CoV-2 *in vitro*, нами была разработана мультиплексная система, позволяющая быстро оценивать аффинность моноклональных антител к S-белкам разнообразных вариантов SARS-CoV-2, а также получать представление о чувствительности таких антител к заменам в его последовательности (рис. 1). Главным преимуществом разработанной системы является то, что за счет возможности различать клетки, несущие разные S-белки по соответствующим флуоресцентным баркодам, анализ связывания интересующего антитела со всеми вариантами S-белков проводится в одной пробирке.

Мы получили моноклоны клеток линии HEK293T, стабильно ко-экспрессирующие баркод и один из вариантов S-белка SARS-CoV-2. Верифицировав экспрессию вариантов S-белков растворимой формой белка-мишени ACE2, мы провели окраску несколькими препаратами RBD-специфичных антител с известными значениями Kd — это антитела casirivimab (REGN10933) и imdevimab (REGN10987) компании Regeneron, антитела iB20, iB12 и iB14, полученные в нашей лаборатории, и антитело VRC01 (негативный контроль) в различных концентрациях от  $2,13 \cdot 10^{-11}$  до  $6,67 \cdot 10^{-8}$  М. Далее, при помощи проточной цитометрии мы определили интенсивность флуоресцентного сигнала, соответствующего плотности связавшихся с определенным вариантом Spike-белка антител. Эти данные позволили рассчитать аффинность каждого из анализируемых антител к каждому из вариантов белка SARS-CoV-2 (рис. 2).

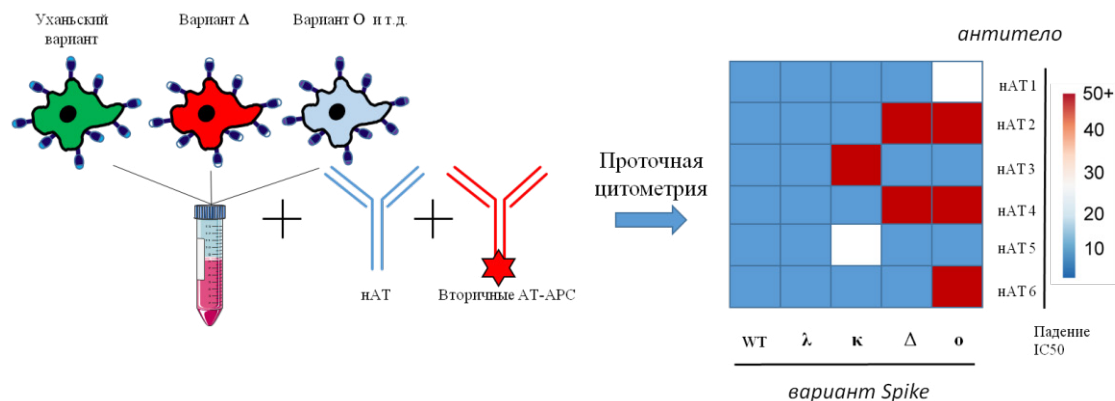


Рис. 1. Принцип работы мультиплексной тест-системы. Баркодированные клетки линии HEK293T, экспрессирующие интересующие варианты Spike-белка SARS-CoV-2 (один «цвет» — один вариант), смешивают в равных пропорциях в одной пробирке, проводят окрашивание моноклональным антителом и детекцию его связывания при помощи проточной цитометрии

Таким образом, полученная нами система позволяет эффективно, воспроизводимо и бюджетно оценивать аффинность связывания антител с S-белками разнообразных вариантов SARS-CoV-2. По мере появления новых вариантов S-белков они могут быть добавлены в панель оболочек, так как четыре используемых нами флуоресцентных белка позволяют формировать до 16 уникальных баркодов, разрешаемых в одной пробирке.

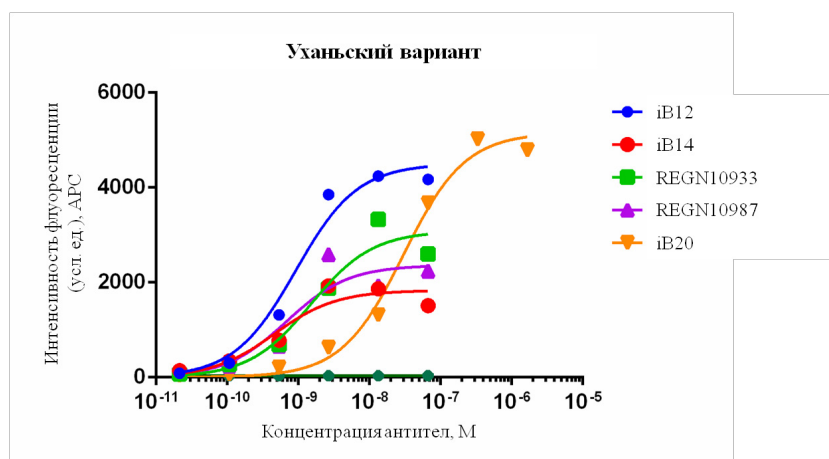


Рис. 2. Определение  $K_d$  антител для различных вариантов Spike-белков при помощи полученной тест-системы (данные приведены только для Spike-белка Уханьского варианта SARS-CoV-2 (WU), остальные данные не приведены)

## РАЗЛИЧИЯ ПРОТЕОМА ЭКСОСОМ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПСЕВДОНОРМАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ И КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗЛИЧНЫМ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ\*

А. А. Шефер<sup>1,2</sup>, Л. В. Яньшолё<sup>3</sup>, А. Е. Григорьева<sup>1</sup>, С. Н. Тамкович<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup>Институт «Международный томографический центр» СО РАН, Новосибирск

✉ a.shefer@g.nsu.ru

### Аннотация

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы, окруженные мембраной, диаметром 30–150 нм. Отличительной чертой от остальных малых везикул является наличие в экзосомах поверхностных тетраспанинов CD9, CD63, CD81 [1]. Показано наличие экзосом практически во всех биологических жидкостях: эти везикулы секретируются всеми клетками организма как в норме, так и при ряде патологических состояний [2].

Для идентификации белков, вовлеченных в опухолевую диссеминацию экзосомы из кондиционной среды клеточных линий HBL-100 (псевдонормальные эпителиоциты молочной железы), MCF-7 (линия с низкой агрессивностью и низким метастатическим потенциалом), BT-549 (линия с высокой агрессивностью и высоким метастатическим потенциалом) в препаративных количествах выделены с помощью комбинации методов ультрафильтрации и ультрацентрифугирования.

При помощи трекового анализа было показано, что линии MCF-7 и BT-549 секретируют в 7 и 4 раза больше экзосом, чем линия псевдонормальных эпителиоцитов HBL-100. В данной работе суммарно идентифицирован 301 белок, 96 из которых (32 %) идентифицированы в составе экзосом впервые согласно базе данных Vesiclepedia. Было выявлено, что 26 идентифицированных нами белков оказались универсальными для всех трех клеточных линий, 8 идентифицированных белков были общими для линий карциномы молочной железы MCF-7 и BT-549, 78, 90 и 76 белков были уникальны для HBL-100, MCF-7 и BT-549 соответственно. Были выявлены значительные изменения в функциональном составе экзосомальных белков, в частности, значительное повышение содержания в составе экзосом опухолевых клеток белков, имеющих ДНК-связывающую функцию и вовлеченных в метаболизм нуклеиновых кислот, также показано, что белки экзосом линии MCF-7, вовлеченные в метастазирование, обладают только каталитической функцией, тогда как в экзосомах линии BT-549 также представлены белки с ДНК-связывающей и каталитической функцией, что может говорить о важности данной функции в процессе метастазирования.

### Литература

1. Théry C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines // J. Extracell. Vesicles. 2018. Vol. 7. № 1. P. 1535750.
2. Kok V.C., Yu C.-C. Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development // Int. J. Nanomedicine. 2020. Vol. 15. P. 8019–8036.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта ИХБФМ СО РАН № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».

**РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЕДИНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ  
НЕСКОЛЬКИХ ВИРУСНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА\***

А. А. Шингарёва, С. А. Лапа, А. В. Чудинов

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, Москва*

✉ topilina\_anastasia@mail.ru

**Аннотация**

Разработан метод совместного обнаружения двух распространённых возбудителей пневмонии человека с помощью мультиплексной ОТ-ПЦР: коронавируса нового типа SARS-CoV-2 и гриппа А.

ПЦР является широко применяемым и востребованным методом идентификации бактериальных и вирусных возбудителей пневмонии, с помощью которого обеспечивается необходимая производительность и воспроизводимость результатов анализа [1]. Для обнаружения РНК-содержащих вирусных возбудителей пневмонии используется ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) [2].

В работе исследовано одновременное детектирование двух социально значимых возбудителей пневмонии — SARS-CoV-2 и гриппа А. Актуальность разработки способа одновременной идентификации возбудителей, характеризующихся сходными клиническими проявлениями, заключается в возможности дискриминации возбудителя в эпидемические периоды для своевременного назначения адекватной терапии.

Для создания мультиплексной ОТ-ПЦР сконструированы видоспецифичные пары праймеров к целевому гену-мишени для каждого из возбудителей, определена оптимальная температура «отжига» [3], т.е. температура плавления дуплексов для полученных праймеров методом градиентной ПЦР. Выявлено, что для сконструированных праймеров оптимальная температура «отжига» равняется 65°C.

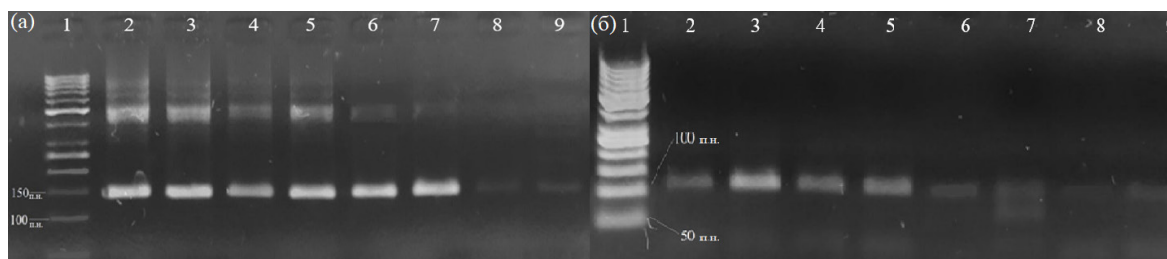


Рис. 1. Электрофореграмма образцов SARS-CoV-2 и гриппа А, полученная после проведения градиентной ПЦР соответственно: а — SARS-CoV-2; б — грипп А; 4 % агарозный гель, окрашенный бромистым этидием; п.н. — пар нуклеотидов. На каждом из рисунков а и б: 1 — маркер длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США), 2-9 — увеличение температуры с 55 до 72 °С

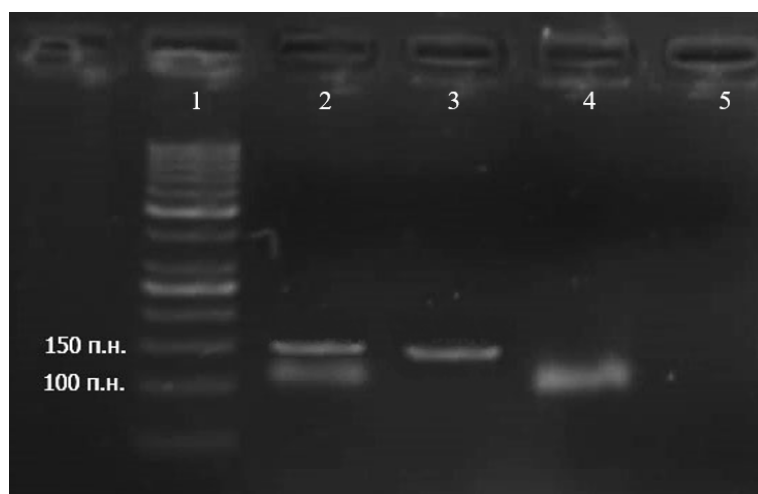


Рис. 2. Электрофореграмма образцов SARS-CoV-2 и гриппа А после проведения мультиплексной ОТ-ПЦР: 1 — маркер длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США); 2 — SARS-CoV-2 и грипп А (см. комментарии в тексте); 3 — SARS-CoV-2; 4 — грипп А; 5 — грипп В (в качестве отрицательного контроля для проверки специфичности праймеров)

Наличие полноразмерного продукта и выход реакции определяли по электрофореграмме (программа «Image J», США).

В ячейке 2 на рис. 2 специально был сконструирован демонстрационный эксперимент для подтверждения возможности одновременного выявления двух возбудителей в одном исследуемом образце.

Показано воспроизводимое дифференциальное определение вирусных возбудителей пневмонии. Разработана система быстрой идентификации вирусных возбудителей пневмонии в мультиплексном варианте.

Полученные результаты могут быть полезны при обнаружении нескольких возбудителей пневмонии.

#### **Литература**

1. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies // J. Vis. Exp. 2012 May 22; (63). P. e3998. doi: 10.3791/3998. PMID: 22664923; PMCID: PMC4846334.

2. Elfman J., Li H. Detection and Measurement of Chimeric RNAs by RT-PCR // Methods Mol. Biol. 2020. № 2079. P. 83-94. doi: 10.1007/978-1-4939-9904-0\_6. PMID: 31728963.

3. Боронбаева А. И., Исакеев М. К., Мамытова А. Т., Нургазиева А. Р. Подбор и оптимизация праймеров для типизации вируса ящура типов а, о // Вестн. АГАУ. 2016. № 7 (141).

## ВКЛАД ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ *MACAB-2* В ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК *SERRATIA MARCESCENS* SM6\*

Т. В. Ширшикова<sup>1</sup>, Л. М. Богомольная<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup>Университет Маршала, Западная Вирджиния, США

✉ bogomolnaya@marshall.edu

### Аннотация

Одной из причин повышенной антибиотикоустойчивости *Serratia marcescens* является присутствие в их клеточных мембранах широкого спектра клеточных насосов (эффлюкс-систем) — белковых комплексов, отвечающих за активное удаление антибиотиков из бактериальных клеток. В дополнение к выводу антибиотиков, эффлюкс-системы также выполняют другие функции, важные для физиологии микроорганизмов, даже в отсутствие антимикробных препаратов.

Одним из механизмов, который обеспечивает бактериальным клеткам повышенную резистентность к широкому спектру антибиотиков, является их активное удаление из клеток с помощью эффлюкс-систем. Эффлюкс-системы являются высококонсервативными белковыми комплексами и присутствуют во всех клетках, от человека до бактерий, что указывает на то, что они являются древними элементами в эволюции различных организмов. Таким образом, помимо устойчивости к антибиотикам, бактериальные эффлюкс-системы участвуют в других физиологических процессах микробных клеток [Alcalde-Rico et al., 2016].

В геноме *Serratia marcescens*, одного из возбудителей нозокомиальных инфекций, идентифицировано несколько локусов, содержащих гены эффлюкс-системы *MacAB*. Как было показано, эффлюкс-система, кодируемая локусом EG355\_04710-EG355\_04715, вовлечена в защиту бактерий от антибиотиков класса аминогликозидов и полимиксинов. Кроме того, инактивация генов эффлюкс-системы *MacAB* в клетках *S. marcescens* SM6 привела к снижению подвижности мутантных клеток [Shirshikova et al., 2021]. Однако второй локус, кодирующий паралог эффлюкс-системы *MacAB-2* (локус EG355\_23545-23550), на сегодняшний день недостаточно полно охарактеризован.

Известно, что бактерии обладают способностью распространяться по полужидкому агару с помощью жгутиков. Такой тип движения называется «swimming» (англ. плавание) [Shanks et al., 2013]. Для определения подвижности исследуемых нами штаммов *S. marcescens* SM6 pBAD30 дикого типа, мутантного штамма с инактивированными генами эффлюкс-системы *macAB-2* pBAD30 и комплементационного штамма *S. marcescens* SM6  $\Delta macAB-2$  pBAD30-*macAB-2*, бактериальную суспензию наносили на поверхность 0,3 % LB-агара.

После 24 ч инкубации при температуре 30 °C дикий тип *S. marcescens* SM6 pBAD30 распространялся в среднем на  $28,86 \pm 3,02$  мм, мутантный штамм  $\Delta macAB-2::CmR$  pBAD30 за это же время распространился в среднем на  $13,63 \pm 0,96$  мм. Подвижность комплементационного штамма осталась на уровне мутантного штамма, составив  $14,25 \pm 0,88$  мм.

На 48 ч инкубации дикий тип *S. marcescens* SM6 pBAD30 распространялся в среднем на  $73,91 \pm 2,79$  мм. Удаление эффлюкс-системы *MacAB-2* значительно уменьшило способность мутантного штамма *S. marcescens* SM6  $\Delta macAB-2::CmR$  pBAD30 к подвижности, почти в два раза — колония достигала в диаметре примерно  $37,69 \pm 3,36$  мм. Подвижность комплементационного штамма не восстановила уровень до фенотипа дикого типа и осталась на уровне мутантного штамма, составив  $33,06 \pm 2,77$  мм.

С целью определения морфологии поверхностных структур исследуемых штаммов использовали трансмиссионную электронную микроскопию (Hitachi HT7700 Exalens).

Установили, что клетки дикого типа *S. marcescens* SM6 pBAD-30 содержали на поверхности перитрихально расположенные длинные жгутики, количество которых значительно уменьшалось у мутантного штамма  $\Delta macAB-2$  pBAD-30. Клетки комплементационного штамма *S. marcescens* SM6  $\Delta macAB-2$  pBAD30-*macAB-2* восстановили способность образовывать жгутики до уровня дикого типа, однако потеряли способность к делению. Мы предполагаем, что комплементация *in trans* генами эффлюкс-системы *MacAB-2* могла не сработать вследствие недостаточной плазмидной экспрессии генов, либо в случае возникновения точечных мутаций в копиях генов эффлюкс-системы *MacAB-2* в процессе клонирования, вследствие чего дефектные гены могли помешать правильной сборке всех белков эффлюкс-системы, а также их функционированию (доминантно-негативная мутация).

Таким образом, опираясь на ранее полученные данные, схожие с нашими, можно предположить, что эффлюкс-система *MacAB-2*, как и эффлюкс-система *MacAB*, участвует в поддержании подвижности *S. marcescens* SM6.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ в рамках проекта № 21-74-00032.

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДЕЛЕЦИИ CGG ПОВТОРА В ГЕНЕ *FMR1* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9\*

Е. М. Шитик, Д. Ю. Прокопов, И. К. Шалик, Д. В. Юдкин

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

✉ shalik\_ik@vector.nsc.ru

### Аннотация

В настоящее время широко изучаются заболевания, причиной которых является экспансия нуклеотидных повторов. Одним из самых распространенных в мире представителей данной группы являются заболевания, связанные с экспансией повторов CGG в 5'-нетранслируемой области гена *FMR1*. В зависимости от размера повторов CGG различают три состояния: норма, премутация и полная мутация, которая является причиной развития синдрома ломкой X-хромосомы (СЛХ) [1]. Ранее исследования экспансии этих микросателлитов были сосредоточены на изучении патогенеза СЛХ, так как преобладало мнение, что носительство премутантного аллеля не способствует развитию клинических проявлений. Однако в дальнейшем было показано, что для носителей премутации характерно повышение уровня транскрипции гена *FMR1*, что фенотипически выражается в виде таких неврологических расстройств, как паркинсонизм, тремор, атаксия, потеря памяти, которые были клинически описаны как синдром тремора/атаксии, ассоциированный с ломкой X-хромосомой (FXTAS). Помимо клинических проявлений при FXTAS было показано наличие эозинофильных внутриядерных включений в нейронах и астроцитах, которые окрашиваются положительно на убиквитин. Исходя из этого, в настоящее время очевидно, что премутационные аллели являются не только источником для развития СЛХ в последующих поколениях, но и становятся причиной самостоятельного синдрома, который требует разработок новых терапевтических решений.

Программируемые РНК-управляемые эндонуклеазы, такие как система CRISPR-Cas, обладают потенциалом в лечении неврологических заболеваний и не раз применялись в разработке терапии синдрома ломкой X-хромосомы. Основным подходом использования данной системы была направленная делеция увеличенного повтора CGG гена *FMR1* [2]. Цель нашей работы — используя технологию CRISPR/Cas9, оценить влияние делеции CGG повтора в состоянии премутации на функцию гена *FMR1* путем анализа наличия убиквитиновых включений. В ходе работы с использованием ресурса Benchling нами проанализированы и подобраны четыре химерных направляющих РНК (хнРНК), комплементарных фланкирующим областям повтора. Анализ осуществлялся на основе показателей целевой (*on-target*) и нецелевой (*off-target*) активности подобранных последовательностей. С использованием подобранных хнРНК было проведено редактирование линии ИПСК ICGi032-A [3], которая была получена из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с синдромом ломкой X-хромосомы. Далее было проведено полногеномное секвенирование выделенной ДНК на платформе Illumina NextSeq до и после делеции индуцированной CRISPR/Cas9. При помощи инструмента GATK был проведен анализ однонуклеотидных замен для поиска нецелевых результатов редактирования. Валидация эффективности системы CRISPR/Cas9 и поиск крупных нецелевых структурных вариантов был проведен с помощью инструмента ExpansionHunter. Была подтверждена делеция CGG повтора в районе 5'-НТО *FMR1*. Кроме того, были обнаружены нецелевые делеции повторов CGG, CNG и CAG в районах генов *PABPN1*, *PHOX2B* и *ATXN7* соответственно. В дальнейшем с использованием подобранной пары гайдов нами будет проведена делеция CGG повтора на премутантном аллеле с последующим анализом наличия убиквитиновых включений и функциональной активности гена.

### Литература

1. Bontekoe C.J.M., Bakker C.E., Nieuwenhuizen I.M. et al. Instability of a (CGG)<sub>98</sub> repeat in the Fmr1 promoter // Human Molecular Genetics. 2001. V. 10. P. 1693–1699.
2. Shitik E.M., Velmiskina A.A., Dolskiy A.A., Yudkin D.V. Reactivation of FMR1 gene expression is a promising strategy for fragile X syndrome therapy // Gene Therapy. 2020. V. 6. P. 247–253.
3. Gridina M.M., Shitik E.M., Lemskaya N.A. et al. Derivation of iPSC cell line (ICGi032-A) from a patient affected with fragile X syndrome // Stem. Cell. Research. 2021. V. 57. P. 102615.

\* Исследования выполнены при поддержке РФФИ № 18-29-07033.  
© Е. М. Шитик, Д. Ю. Прокопов, И. К. Шалик, Д. В. Юдкин, 2022



**TG2 И МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ В КОНТЕКСТЕ ОТВЕТА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК\***

Е. А. Шмидт, Е. Ю. Смирнов, Н. А. Барлев

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

✉ evashmidt28@gmail.com

**Аннотация**

В данной работе исследовалась взаимосвязь между метилированием гистонов и тканевой трансклутаминазой и её влияние на выживаемость мышечных эмбриональных фибробластов после обработки противоопухолевыми препаратами.

Трансклутаминаза — фермент, катализирующий образование ковалентных сшивок между свободными аминокетонами. Тканевая трансклутаминаза (TG2) повсеместно встречается как в клетке, так и во внеклеточном пространстве. Участвует в процессах апоптоза, передачи сигналов и клеточной адгезии, а также ассоциирована со многими заболеваниями, такими как болезни Альцгеймера и Паркинсона, целиакия, фиброзы и онкологии. Одним из подходов к лечению онкологических заболеваний является химиотерапия, которая включает в себя широкий спектр препаратов. Доксорубин, этопозид, цисплатин — ДНК-повреждающие агенты широко применяются в противоопухолевой терапии.

С помощью МТТ-теста обнаружено снижение выживаемости клеточной линии мышечных эмбриональных фибробластов, нокаутных по гену TG2, в сравнении с линией дикого типа при обработке доксорубином, этопозидом и цисплатином. Было предположено, что повышение чувствительности нокаутной клеточной линии может быть обусловлено либо изменением экспрессии белков связанных с множественной лекарственной устойчивостью, либо нарушением сигнальных путей в репарации, либо модификациями гистонов, связанных с ответом на повреждение ДНК. Среди гистоновых модификаций особое место занимает метилирование гистонов, представляющее собой эпигенетическую модификацию белка, участвующего в упаковке ДНК. Метилирование позволяет регулировать экспрессию генов, ингибировать или индуцировать клеточные процессы. К примеру, монометилирование 4-го гистона по 20-му лизину влияет на активацию транскрипции, а деметилирование участвует в маркировке точек репликации и связано с 53BP1 — центральным фактором репарации.

По результатам иммуноблоттинга в клетках с подавленной экспрессией TG2 в сравнении с диким типом виден рост количества белков H3K4me3, H4K20me1 и H4K20me2 и снижение H3K9me3, H3K36me3. Методом Real-time PCR показано отсутствие изменения в экспрессии метилаз KMT5A, KMT5B, KMT5C на уровне РНК, но происходит небольшое повышение уровня экспрессии деметилазы RNF8 в нокаутной линии.

Изменение чувствительности к ДНК-повреждающим агентам при нокауте TG2 может быть обусловлено изменением в профиле метилирования гистонов, однако, несмотря на существенное различие в уровнях метилированных гистонов между линией с нокаутом TG2 и линией дикого типа, нами не было обнаружено значительной разницы в экспрессии метилаз и деметилаз гистонов на уровне РНК.

Изменения экспрессии метилаз KMT5A, KMT5B, KMT5C на уровне РНК не происходит, однако уровень экспрессии деметилазы RNF8 немного повышен в нокаутной линии.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЛОКУСА КЕРАТИНОВЫХ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА \*

А. С. Штомпель<sup>1,2</sup>, М. К. Сидорова<sup>3</sup>, Е. П. Калабушева<sup>4</sup>, С. В. Ульянов<sup>1,2</sup>, С. В. Разин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

<sup>2</sup>Институт биологии гена РАН, Москва

<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва

<sup>4</sup>Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва

✉ shtompel.an@gmail.com

### Аннотация

Пространственная организация генома играет важную роль в регуляции клеточной дифференцировки. На примере локуса кератиновых генов человека мы охарактеризовали динамику пространственной структуры локуса в ходе эпидермальной дифференцировки, а также раскрыли возможные механизмы образования регуляторных контактов.

Пространственная организация хроматина — это один из уровней регуляции экспрессии генов. Известно, что топология дифференциально экспрессирующихся геномных локусов меняется по ходу клеточной дифференцировки строго определённым образом, и нарушения в этом процессе могут быть причиной сбоев в программе экспрессии, приводя к развитию тяжелых заболеваний.

В качестве модельного объекта нами был выбран локус кератиновых генов человека (12q13.13). Ранее с использованием метода фиксации конформации хромосом C-TALE мы продемонстрировали, что локус кератиновых генов обладает сложной пространственной организацией, и идентифицировали потенциальные зоны контроля локуса (Locus Control Region, LCR1 и LCR2), участвующие в регуляции экспрессии в пределах локуса.

В рамках данной работы мы охарактеризовали изменение пространственной структуры локуса кератиновых генов в ходе эпидермальной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Мы обнаружили, что в ходе дифференцировки ИПСК в первую очередь устанавливается контакт между LCR1 и LCR2, и это происходит до активации экспрессии гена *KRT5*, характерной для кератиноцитов. В дифференцированных клетках, где *KRT5* активно транскрибируется, формируется контакт между промотором *KRT5* и обеими LCR, что позволяет говорить о потенциальной возможности формирования тройственного регуляторного комплекса. Полученные результаты согласуются с данными, полученными методом 3D-FISH в сочетании со сверхразрешающей микроскопией STED. Мы обнаружили, что в иммортализованных кератиноцитах HaCaT, в которых локус кератиновых генов активен, локус более компактен, чем в недифференцированных ИПСК.

Также мы показали, что при обработке 1,6-гександиолом, разрушающим фазовые конденсаты, исчезают контакты между *KRT5* и обеими регуляторными областями, а также ослабление петлевого контакта между LCR1 и LCR2, что указывает на возможную роль фазовой сепарации в формировании этих контактов. Кроме того, ChIP-seq-анализ показал снижение уровня связывания когезина в районе промотора *KRT5* в клетках, обработанных 1,6-гександиолом, что может говорить в пользу совместного действия механизмов экструзии хроматина и фазовой сепарации в формировании сети регуляторных контактов локуса кератиновых генов.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ #20-04-00778.

© А. С. Штомпель, М. К. Сидорова, Е. П. Калабушева, С. В. Ульянов, С. В. Разин, 2022

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\***Ю. Е. Шулепова<sup>1,2</sup>, Е. А. Колесникова<sup>2</sup>, С. А. Куклина<sup>1</sup><sup>1</sup>Кировский государственный медицинский университет<sup>2</sup>Молекулярно-генетическая лаборатория ОПАО ГБУЗНО «НОКОД», Нижний Новгород

✉ yushu19@yandex.ru

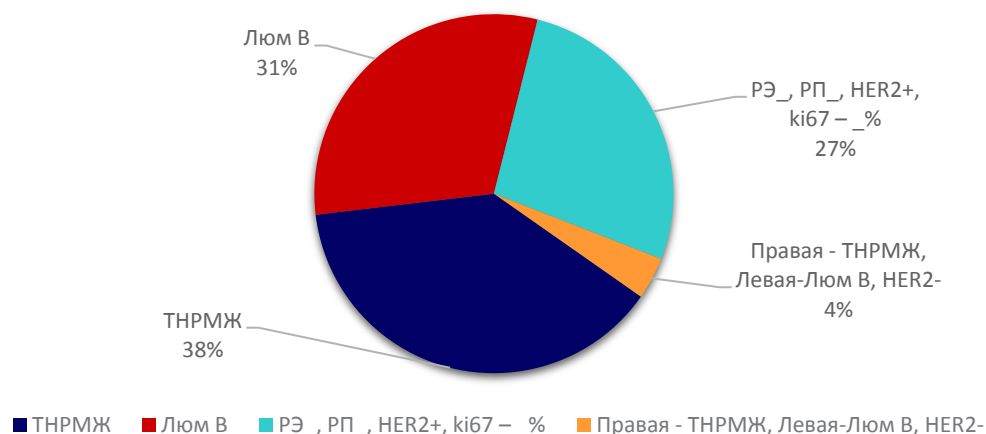
**Аннотация**

Рак молочной железы (РМЖ) — одна из самых актуальных проблем современной клинической онкологии, ежегодно регистрируется более 1 миллиона новых случаев этого заболевания. В большинстве экономически развитых стран этой патологии принадлежит первое место в структуре заболеваемости женского населения. В современном мире медико-генетическое консультирование является обязательной составляющей онкологической помощи. По данным разных авторов, около 10 % РМЖ является наследственным (НРМЖ). Наиболее часто НРМЖ ассоциирован с герминальными мутациями в генах, участвующих в процессах гомологичной рекомбинации ДНК, а именно *BRCA1/2* и *CHEK2*.

**Цель:** Выявление носителей частых герминальных мутаций в генах *BRCA1/2* у нижегородских пациентов с РМЖ посредством метода ПЦР.

**Материалы и методы**

В период с января по июль 2022 г. проведено тестирование 366 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ в возрасте от 27 до 82, средний возраст 55 лет; из них 361 женщина, 5 мужчин. Материалом для исследования служила цельная кровь, отобранная в одноразовые вакуумные пробирки с ЭДТА. Методом исследования являлась ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления. В результате взаимодействия ДНК с флуоресцирующими зондами, уровень свечения изменяется, фиксируется и представляется в виде графика.

**Молекулярные подтипы при мутациях в генах *BRCA1/2*****Результаты**

Частые герминальные мутации в гене *BRCA1* с использованием ПЦР-тестирования выявлены у 16 пациентов (4,4 %). Так, у 11 пациентов обнаружена инсерция цитозина в положении 5382 («founder» мутация в России), у двух — замена T > G в позиции 300, а также в единичных случаях были выявлены делеции — 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 2080delA. При отсутствии частных наследственных мутаций материал пациентов отправляется на расширенное тестирование широкой панели значимых генов с использованием NGS-секвенирования. NGS позволило дополнительно выявить у 10 пациентов с РМЖ редкие герминальные мутации в различных генах, чья роль в развитии НРМЖ является установленной. У четырех пациентов выявлены редкие мутации в гене

*BRCA2*:c.4409\_4410del, c.9253delA, c.4765\_4766dupCC, c.202\_217del; у двух пациентов обнаружена мутация в гене *BRCA1*:c.3381del, у двух пациентов в гене *CHEK2*:c.470T>C, *CHEK2*:del5395, у одной в гене *PALB2*:c.1592del. Следует отметить, что у одной пациентки с отягощенным наследственным онкологическим анамнезом и метастатическим раком обеих молочных желез определена крайне редкая мутация в гене *CTNNA1*:c.449T>G.

У 10 из 26 пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* по результатам ИГХ сотрудники лаборатории выявили молекулярный подтип — ТНРМЖ, что составляет 38,4 %. А у 8 из 26 пациентов выявили молекулярный подтип — Люм В, что составляет 30,7 %. У одной пациентки с двусторонним РМЖ по результатам ИГХ заключили, что справа — ТНРМЖ, слева — Люм В.

### **Выводы**

В период с января по июль 2022 г. герминальные мутации, обуславливающие НРМЖ, были выявлены у 26 нижегородских пациентов с РМЖ (7,1 %). Проведение подобных исследований в рутинной клинической практике крайне важно для определения прогноза и тактики лечения пациентов, кроме того, необходимо проведение генетического тестирования родственников пациентов на предмет носительства наследственных мутаций, повышающих риск развития злокачественных новообразований.

### **Литература**

1. Лазарев А. Ф., Задонцева Н. С., Гофман А. А. Наследственный рак молочной железы // Росс. онкол. журнал. 2014. № 2. С. 40–46.
2. Лаптев С. А., Корженевская М. А., Имянитов Е. Н. Молекулярно-генетический «портрет» рака молочной железы // Учен. зап. СпбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 2017. № 24(2). С. 12–22.
3. Ueki A., Hirasawa A. Molecular Features and Clinical Management of Hereditary Gynecological Cancers // International Journal of Molecular Sciences. 2020. № 21, 9504. P. 16.

**ВЫЯВЛЕНИЕ *COXIELLA BURNETII* ИЗ КЛЕЩЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН, 2021-2022 ГГ.**

Г. О. Шыныбекова<sup>1</sup>, Н. Н. Мухами<sup>1</sup>, Н. С. Кожабергенов<sup>1</sup>, А. У. Исабек<sup>1</sup>, А. И. Тагайев<sup>1</sup>, Т. А. Кисык<sup>2</sup>,  
А. А. Копбаева<sup>2</sup>, А. М. Мелисбек<sup>1</sup>, О. В. Червякова<sup>1</sup>, М. Б. Орынбаев<sup>1</sup>, К. Т. Султанкулова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»  
МЗ РК, пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, Казахстан

<sup>2</sup>Куланский агротехнический высший колледж, с. Кулан,  
Турар Рыскуловский район, Жамбылская область, Казахстан

✉ gaukhar\_1988@bk.ru

**Аннотация**

Настоящее исследование направлено на выявление распространенности и оценку зоонозного потенциала возбудителя Ку-лихорадки, переносимого клещами, встречающимися в разных регионах Казахстана.

Ку-лихорадка (кокциеллез) — широко распространенная во всех странах мира зооантропонозная, природно-очаговая болезнь домашних, промысловых и диких животных, птиц и человека. Инфекции, возбудители которых передаются человеку иксодовыми клещами, составляют достаточно большую группу инфекционных заболеваний, разнообразных как по этиологии, так и по своим клиническим проявлениям [1]. На сегодняшний день существует много исследований о клещах и клещевых возбудителях. Однако возбудители Ку-лихорадки, переносимые клещами в различных регионах Казахстана, мало изучены. Целью работы являлось выявление возбудителя Ку-лихорадки *Coxiella burnetii* у клещей, доставленных из разных регионов Республики Казахстан.

В апреле–июне 2021–2022 гг. проведен сбор клещей у крупного рогатого скота в сельских районах Западно-Казахстанской области, Туркестанской области и Жамбылской области страны. В ходе исследования были обнаружены у 16 проб (12,6 %) возбудитель Ку-лихорадки из 126 проанализированных пулов клещей. Возбудитель *Coxiella burnetii* выявился в образцах (0,8 %), доставленных из Жамбылской области в 2021 году от клещей *D. marginatus* (9,5 %), из Туркестанской области от клещей разных видов: *D. marginatus*, *H. scupens*, *H. anatolicum* и (2,3 %) Западно-Казахстанской области от клещей *D. marginatus*, *H. asiaticum*, *H. marginatum* в 2022 году.

Секвенирование проводилось с помощью праймеров, специфичных участку гена IS1111A *Coxiella burnetii*, который транслирует белок транспозазу. Анализ данных, полученных в результате секвенирования, показал 100 % идентичность полученной нуклеотидной последовательности со штаммами *Coxiella burnetii*, которые имеются в базе данных NCBI (инвентарный номер GenBank CP007555, CP018150).

Это исследование показывает распространенность кокциеллеза, передаваемого клещами на территории Казахстана. Сложившаяся ситуация по распространению иксодовых клещей как переносчиков Ку-лихорадки в Республике Казахстан, требует дальнейшего изучения ареалов, численности и инфицирования этих членистоногих.

**Литература**

1. Джумагулова А.Ш., Абдикеримов М.М., Муканбеткеримова Г.М. Клещевые инфекции в Нарынской области // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 2.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ БЕЛКОВ-РЕЦЕПТОРОВ QS СИСТЕМЫ МОРСКИХ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *ALIIVIBRIO LOGEI* К СВЯЗЫВАНИЮ С 3OXOC6-HSL, C8-HSL И 3ОНС10-HSL\*

Е. С. Щеглова, С. В. Баженов, И. В. Манухов

Московский физико-технический институт

✉ scheglova.es@phystech.edu

### Аннотация

*Quorum sensing* система бактерий *A. logei* содержит два гомологичных рецепторных белка: LuxR1 и LuxR2. Показано, что LuxR1 значительно слабее активирует транскрипцию и обладает меньшей чувствительностью к аутоиндуктору, чем LuxR2. Их ДНК-связывающие С-домены, не способные к связыванию с аутоиндуктором, не отличаются друг от друга по специфичности к ДНК и способности активировать транскрипцию.

Чувство кворума, или *quorum sensing* (QS), — это способность бактерий координировать свое поведение в зависимости от плотности популяции. Бактерии синтезируют и испускают сигнальные молекулы, называемые аутоиндуктором (АИ). При достижении пороговой концентрации АИ в окружающей среде белки-рецепторы связываются с АИ и в связанном виде управляют экспрессией генов, находящихся под контролем QS-системы [1]. Морские мезофильные бактерии *Aliivibrio fischeri* с помощью QS-системы регулируют экспрессию генов люминесценции. Рецепторный белок LuxR в данных бактериях при помощи N-домена связывается с АИ, димер комплексов LuxR-АИ при помощи С-домена LuxR связывается с *lux*-боксом-последовательностью в промоторной области оперона *luxCDABEG* и активирует транскрипцию генов люминесценции [2].

В отличие от *A. fischeri*, у психрофильных бактерий *Aliivibrio logei* *lux*-оперон регулируется двумя *luxR*-генами, кодирующими LuxR1- и LuxR2-белки [3]. Данные рецепторы значительно отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности (гомология 76 %), что позволяет предположить различия в их свойствах. Настоящая работа посвящена определению чувствительности белков LuxR1 и LuxR2 *A. logei* к различным аутоиндукторам.

На первом этапе была определена чувствительность данных белков к 3OxoC6-HSL — основному АИ *A. logei*, 3ОНС10-HSL и C8-HSL — АИ, к которым у ближайшего гомолога, белка LuxR *A. fischeri*, появляется специфичность при помощи нескольких точечных мутаций [4]. Для достижения данной цели использовались цельноклеточные биосенсоры на основе *Escherichia coli*, в которых экспрессия генов люминесценции бактерий *Photobacterium luminescens* в присутствии АИ индуцируется рецепторными белками LuxR1 или LuxR2 *A. logei*. Измерения показали, что по сравнению с LuxR2, LuxR1 обладает меньшей чувствительностью ко всем использованным в работе АИ.

Такое различие в чувствительности рецепторных белков *A. logei* к АИ может объясняться как лучшей способностью LuxR2 связываться с АИ, так и лучшей способностью LuxR2 связываться с ДНК. В работе [5] было показано, что удаление N-домена превращает LuxR *A. fischeri* в АИ-независимый активатор транскрипции. Поэтому для того, чтобы определить, чем именно обусловлено различие в чувствительности рецепторов к АИ, на следующем этапе была определена специфичность С-доменов LuxR1 и LuxR2 к последовательности связывания LuxR-ДНК.

Для достижения данной цели были сконструированы биосенсоры, в которых присутствовал один из С-доменов LuxR белков под контролем индуцируемого промотора и гены люминесценции *luxCDABE* *P. luminescens* под контролем промотора *PluxCDABEG* *A. logei* с различными *lux*-боксами (два из которых нативные, два — созданные на основе консенсусной последовательности). Измерения показали, что С-домены белков LuxR1 и LuxR2 не отличаются друг от друга по специфичности к последовательности ДНК и эффективность активации промотора белками С-LuxR1 и С-LuxR2 одинаково зависит от последовательности ДНК в сайте посадки — чем симметричнее и ближе к консенсусу сайт посадки, тем сильнее активация транскрипции.

Полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о том, что различия в способности белков LuxR1 и LuxR2 активировать *lux*-регулон в присутствии АИ обусловлены разницей в работе их N-домена, связывающегося с АИ.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1164.2022.1.4.  
© Е. С. Щеглова, С. В. Баженов, И. В. Манухов, 2022

**Литература**

1. Miller M. B., Bassler B. L. Quorum Sensing in Bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* Oct. 2001. vol. 55. № 1. p. 165–199. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.
2. Bassler B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing // *Curr. Opin. Microbiol.* Dec. 1999. vol. 2. № 6. p. 582–587. doi: 10.1016/S1369-5274(99)00025-9.
3. Манухов И. В. Структура lux-оперонов и механизмы регуляции типа ‘Quorum sensing’ у морских бактерий. 2007.
4. Colton D. M., Stabb E. V., Hagen S. J. Modeling Analysis of Signal Sensitivity and Specificity by *Vibrio fischeri* LuxR Variants // *PLoS One.* May 2015. vol. 10. № 5. p. e0126474. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0126474.
5. Choi S. H., Greenberg E. P. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain // *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 88. № 24. P. 11115–11119. Dec. 1991. doi: 10.1073/PNAS.88.24.11115.

## АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ\*

А. А. Щеголева<sup>1,2</sup>, А. А. Пономарева<sup>1</sup>, П. А. Гервас<sup>1</sup>, Т. С. Геращенко<sup>1</sup>,  
О. В. Панкова<sup>1</sup>, А. А. Зарубин<sup>3</sup>, В. М. Перельмутер<sup>1</sup>, Н. В. Чердынцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии

Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

<sup>2</sup>Томский государственный университет

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики

Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

### Аннотация

Плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) возникает в результате прогрессивно развивающихся на фоне хронического воспаления морфологических изменений эпителия бронхов: базальноклеточной гиперплазии (БКГ), плоскоклеточной метаплазии (ПМ) и дисплазии (Д). В литературе представлены данные о том, что встречаются разные варианты сочетаний предопухолевых изменений бронхиального эпителия: изолированная БКГ (иБКГ), комбинации БКГ с ПМ (БКГ+пм+) и ПМ с дисплазией (ПМ+д+). Предраковым заболеванием является хроническая обструктивная болезнь легких — ХОБЛ, при которой существенно повышен риск ПКРЛ. Метилирование ДНК является одним из ранних событий малигнизации. Идентификация специфических сигнатур предопухолевых изменений имеет фундаментальную значимость и расширяет представления о молекулярном патогенезе рака легкого, открывает маркеры прогноза.

Целью настоящей работы явилось изучение профиля метилирования ДНК при различных предопухолевых изменениях бронхиального эпителия с целью выявления измененных локусов на ранних этапах опухолевой трансформации. С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss) получали образцы БКГ, ПМ, Д и ПКРЛ от больных с диагнозом ПКРЛ ( $n = 26$ ). Для приготовления ДНК-библиотек для полногеномного секвенирования использовали набор Pico Methyl-Seq Library Prep Kit. Кроме того, в исследовании использовали образцы венозной крови, полученной от больных ХОБЛ ( $n = 28$ ). Из плазмы крови выделяли внеклеточные ДНК (внДНК) с помощью наборов QIAmp MinElute ccfDNA Kit. Проводили локус-специфичное секвенирование для исследования метилирования во внДНК. Приготовление библиотек осуществляли с использованием наборов KAPA Prep Library Kit. При полногеномном секвенировании выявлены различия по уровню метилирования CpG-сайтов в составе 5'-UTR, экзонов и интронов генов. При иБКГ в сравнении с нормальной тканью выявлены изменения уровня CpG-сайтов только в составе некодирующих областей. В БКГ+пм+ показаны изменения уровня метилирования CpG-сайтов в области экзонов генов: гиперметилирование *CTBP2*, *MUC6*, *MUC12* и гипометилирование *UPF1*, *ATF4*, *MUC5AC*, гипометилирование в области интронов *BAGE*, *GPHN*. При Д в сравнении с ПМ+д+ найдены изменения уровня метилирования CpG-сайтов: 1) гипометилирование в экзоне гена *MUC3A*, 2) гиперметилирование в интронах генов *UPS48*, *CC2D2A* и гипометилирование в интронах генов *FBLN7*, *AFG1L*, *GPC5*, *WDR59*, *GPR83*, *ATXN2*, *FBXO36*. При ПКРЛ в сравнении с Д выявлено гиперметилирование в экзонах генов *MUC3A*, *CDC27*, гиперметилированием в интронах генов *UTP6*, *TTC34RBM6*, *SENP5* и гипометилированием в интронах генов *UNC45B*, *SYNE2*, *SUPT3H*, *ZDHHC21*, *FER*. Выявлена тенденция к увеличению уровня метилирования CpG-сайтов в области 5'-UTR для *DCDC1*, *RARB*, *PGPEP1L*, *ZNF260*, *MTRNR2L2*, *MTRNR2L6*, *ERAP1* в ряду: ПМ-Д-ПКРЛ. Далее нами проведена валидация полученных данных на образцах внДНК крови от больных ХОБЛ и анализ ассоциации с результатами мониторинга пациентов. Исследован уровень метилирования генов *RARB*, *DCDC1*, *ZNF260*. Выявлено гиперметилирование CpG-сайтов генов *ZNF260*, *DCDC1*, *RARB*. При этом показано, что частота встречаемости гиперметилирования генов *RARB*, *ZNF260* выше у пациентов, у которых в течение двух лет наблюдения был диагностирован рак. Выявлено три кластера пациентов с ХОБЛ в зависимости от уровня метилирования CpG-сайтов в составе генов *RARB*, *ZNF260*. Таким образом, полученные данные указывают на то, что метилирование ДНК в эпителии бронхов в значительной степени меняется в процессе прогрессии предопухолевых изменений, начиная с ранних стадий — на этапе БКГ и ПМ. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения того, какие из обнаруженных изменений могут выступать в роли триггеров прогрессии предопухолевых изменений в ПКРЛ и свидетельствовать об обратимости перехода между различными морфологическими изменениями бронхиального эпителия.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-06002.



**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕЙ НЕВЫЯВЛЕННОЙ ПЕРВИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ**

А. А. Щеголева, Р. С. Воробьев, Е. В. Денисов

*Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН*

✉ shegolmay@gmail.com

**Аннотация**

Опухоли невыявленной первичной локализации — это заболевания, проявляющиеся метастатическими опухолями, при которых первичный очаг невозможно установить ни на основании анамнеза, ни по данным обследований.

Одной из причин возникновения данного типа злокачественных новообразований могут быть нарушения в генах-регуляторах клеточной миграции, в частности эпителиально-мезенхимального перехода. В исследовании использовалось полноэкзомное секвенирование с целью определения генетических нарушений в опухолях невыявленной первичной локализации.

Опухоли невыявленной первичной локализации (ОНПЛ) — это метастатическое проявление рака, при котором первичная локализация опухоли на момент постановки диагноза не может быть обнаружена. Хотя частота выявления ОНПЛ не является высокой, данное заболевание характеризуется высокой агрессивностью и низкой эффективностью лечения, и значительное число больных имеют низкую выживаемость. Поэтому понимание биологии и механизмов формирования данного типа злокачественных новообразований является важной задачей.

Механизмы возникновения ОНПЛ до сих пор неизвестны. Одной из причин возникновения ОНПЛ могут быть нарушения в генах-регуляторах клеточной миграции, в частности эпителиально-мезенхимального перехода. Предполагается, что появление мутаций в данных генах приводит к фиксации клеток в состоянии гибридного эпителиально-мезенхимального перехода и приобретения ими способности к инвазии и метастазированию. Соответственно, исследование мутационного ландшафта ОНПЛ актуально и может пролить свет не только на природу данного типа злокачественных новообразований, но и выявить новые гены-регуляторы миграции и инвазии опухолевых клеток. *Целью настоящего исследования* было определение специфических генетических нарушений в ОНПЛ.

В исследование включены семь пациентов с ОНПЛ на момент диагностики. Выделение ДНК проводилось с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США). Полученные образцы ДНК ( $n = 7$ ) использовали для подготовки экзомных библиотек с помощью набора SureSelect XT v. 7.0 (Agilent, США). ДНК-библиотеки секвенировали на платформе NextSeq 2000 (Illumina, США). Биоинформатический анализ данных проводился с помощью пайплайна GATK. Генетические варианты аннотировали с помощью инструмента ANNOVAR. Для поиска генов-драйверов канцерогенеза использовался инструмент IntOGen. Для предсказания функциональной значимости мутаций использовали инструменты SIFT и PolyPhen2. Для детекции aberrаций числа копий ДНК использовался инструмент CNVkit.

В ОНПЛ обнаружены однонуклеотидные замены и нарушения по типу инсерций и делеций в генах *KDM6A*, *BRCA2*, *MYH9*, *KMT2A* и *FGD5*, ранее описанных как драйверы развития различных злокачественных новообразований, и генах *TTN*, *HMCN2*, *MUC5AC* и *OPLAN*. Помимо этого для ОНПЛ были характерны aberrации числа копий ДНК в хромосомных регионах, содержащих гены *FAM110C*, *SH3YL1*, *PLEKHG4B*, *WASHC1*, *CHL1* и *DOC2B*. Функциональное аннотирование вышеуказанных генов показало вовлеченность большего их числа в клеточную адгезию, ремоделирование актинового цитоскелета, формирование ламеллиподий и филоподий, эпителиально-мезенхимальный переход и регуляцию аутофагии.

**Заключение**

ОНПЛ несут нарушения, которые в большинстве своём затрагивают гены-регуляторы клеточной миграции и инвазии.

## ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК-ПЕПТИДНЫХ СШИВОК С АП-САЙТАМИ \*

А. В. Юдкина<sup>1,2</sup>, Н. А. Булгаков<sup>1</sup>, Д. В. Ким<sup>1,2</sup>, Д. О. Жарков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

✉ ayudkina@niboch.nsc.ru

### Аннотация

Апурин-апиримидиновые сайты (АП-сайты) — наиболее частые спонтанные повреждения ДНК, которые возникают при утере основания ДНК. АП-сайты крайне реакционноспособны и охотно реагируют с нуклеофильными группами с образованием ряда аддуктов. Так как ДНК постоянно окружена широким набором разнообразных белков, это часто приводит к образованию объемных ДНК-белковых сшивок с АП-сайтами. Репарация ДНК-белковых сшивок начинается с протеолиза сшитого белка до небольшого пептида, однако в настоящий момент совершенно не известно, что происходит с оставшимися ДНК-пептидными сшивками с АП-сайтами в клетке в дальнейшем.

В рамках работы мы исследовали два основных аспекта генотоксичности ДНК-пептидных сшивок с АП-сайтами: возможность репликативного аппарата клетки преодолевать такое повреждение и возможные пути его репарации. Нами были получены модельные ДНК-пептидные сшивки с АП-сайтами разной структуры: с линейным сшитым пептидом и с разветвленным пептидом. Мы проверили блокирующие свойства такого рода повреждений для ДНК-полимераз разных семейств в условиях процессивного синтеза. Оказалось, что блокирующие свойства пептидных сшивок с АП-сайтом в целом соизмеримы с блокирующими свойствами альдегидного АП-сайта, а блокирующие свойства более объемного разветвленного пептида, сшитого с АП-сайтом, были выше, чем у линейного пептида. Наблюдаемые точки паузы синтеза свидетельствуют о сложности ДНК-полимераз включать нуклеотид напротив не кодирующего сайта сшивки пептида с АП-сайтом, а также низкой эффективности следующего шага элонгации после повреждения. При изучении путей репарации ДНК-пептидных сшивок с АП-сайтами мы показали, что АП-эндонуклеазы суперсемейства «ТМ-бочка» эффективно процессируют пептидные конъюгаты с АП-сайтами, при этом процессинг более объемного разветвленного пептида был эффективнее, чем для линейного пептида, что свидетельствует в пользу возможной биологической роли данных ферментов в репарации пептидных аддуктов с АП-сайтами в клетке.

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-74-00061, <https://rscf.ru/project/21-74-00061/>  
© А. В. Юдкина, Н. А. Булгаков, Д. В. Ким, Д. О. Жарков, 2022

## УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Abilova Zh. ....	466	Goverdovsky D. V. ....	99	Mikhailova A. G. ....	16
Akhatova F. S. ....	172	Gurkov A. N. ....	218	Mikushina A. D. ....	338
Akhmetova A. ....	466	Gusarov Y. S. ....	16	Mitin D. E. ....	370
Akilzhanova A. ....	466	Humam A. ....	244	Morgunova M. M. ....	67
Akimkin V. G. ....	13, 442	Hussein Z. ....	692	Moskaliuk V. S. ....	594
Aksenov V. V. ....	532	Ilchibaeva T. V. ....	594	Mungalov R. V. ....	599
Anisimova E. A. ....	172	Imidoeva N. A. ....	67	Nadtoka M. I. ....	442
Arisov M. V. ....	543	Indyuhova E. N. ....	543	Naumenko V. S. ....	594
Ateiah M. ....	70	Ishemgulov A. T. ....	336	Nazarova A. A. ....	218
Axenov-Gribanov D. V. ....	67	Islamova L. N. ....	709	Nour M. A. Y. ....	609
Azarnova T. O. ....	543	Ivankova O. V. ....	245	Orlov M. ....	244
Babenko D. B. ....	550	Ivanov I. V. ....	532	Ozhegov G. D. ....	172
Bagaev A. V. ....	10	Joshi V. ....	573	Pastré D. ....	573
Barkhanskaya V. I. ....	550	Kadyrova I. A. ....	550	Patra C. ....	562
Belyshenko A. Y. ....	67	Kalacheva N. V. ....	709	Patra C. ....	624
Borisova N. I. ....	442	Kalganova A. I. ....	338	Pereliaeva E. V. ....	67, 370
Borvinskaya E. V. ....	218	Kalinin R. S. ....	426	Podvalny A. M. ....	99
Bratchikov S. S. ....	10	Karamova N. S. ....	245	Pogorelkina E. A. ....	228
Budaeva M. V. ....	99	Karaseva O. S. ....	172	Popadin K. Y. ....	16, 36
Budkina A. Y. ....	13	Kassymkhanova A. ....	466	Poroikov V. ....	48
Burskaya V. O. ....	16	Kayumov A. R. ....	700	Pozhitnova V. O. ....	548
Chamoieva A. ....	466	Khafizov K. F. ....	13, 442	Roev G. V. ....	442
Chanyshev M. D. ....	442	Kirilyuk I. A. ....	370	Rubel M. ....	70
Chekunova E. M. ....	497	Kisel M. S. ....	177	Ruleva A. Y. ....	67
Chernova L. S. ....	700	Kislova A. V. ....	548	Rybkin I. ....	244
Chernyshev V. S. ....	99	Kolesnichenko S. I. ....	550	Rzhechitskiy Y. A. ....	218
Chubarov A. S. ....	370	Kolesnikova Ye. A. ....	550	Sabirova Z. R. ....	245
Chudakov D. M. ....	599	Kolpashchikov D. M. ....	70, 562, 609, 624, 692	Saenko V. V. ....	442
Clément M. J. ....	573	Komissarov A. S. ....	49, 50	Shafiullina R. R. ....	532
Danilov L. G. ....	50, 426	Korshukov I. V. ....	550	Sharapova G. R. ....	709
Dmitrieva M. E. ....	67	Kotov I. A. ....	13	Sharshov K. A. ....	333
Dobrynin S. A. ....	370	Kozhamkulov U. ....	466	Shelkovnikova V. N. ....	67
Dorofeev D. V. ....	336	Kozhemyakina R. V. ....	594	Shishkina E. S. ....	218
Drozdova P. B. ....	218	Kulikov A. V. ....	594	Shmarova A. A. ....	296
Efimenko B. E. ....	16, 36	Kulikova A. V. ....	562	Sizova I. A. ....	497
Eldeeb A. A. ....	562, 609, 624, 692	Kulikova E. A. ....	594	Smirnov V. ....	624
Eliseev I. E. ....	338	Kurbanov G. F. ....	609	Stasevski Z. ....	245
Fakhrullin R. F. ....	172	Kusakin A. V. ....	426	Stolbov L. ....	48
Fazleeva G. M. ....	709	Lavrik O. I. ....	573	Sukhanova M. V. ....	573
Fefelova E. I. ....	548	Leonov S. V. ....	99	Sukhanova X. V. ....	49, 50
Filimonov D. ....	48	Letuta S. N. ....	336	Svirid A. V. ....	177
Gadzhieva E. P. ....	548	Lobanova V. V. ....	36	Sviridov P. S. ....	548
Gandalipov E. ....	70	Madyarova E. V. ....	218	Tarasiuk A. V. ....	594
Gilep A. A. ....	177	Mamontova E. M. ....	573	Tarasova G. R. ....	709
Glotov O. S. ....	426	Marusich E. I. ....	99	Telnova T. Y. ....	67
Goleva O. V. ....	426	Maximov V. I. ....	543	Timofeyev M. A. ....	218
Golovanov A. B. ....	532			Tsai V. V. ....	426

- Tsentalovic Yu. P. ....333  
 Tsurko D. E. ....336  
 Tuama A. A. ....245  
 Turchaninova M. A. ....599  
 Tutykhina I. L. ....105  
 Vakhtinskii V. M. ....105  
 Verbenko V. N. ....497  
 Virolainen P. A. ....497  
 Vishnyakov I. E. ....700  
 Vlasova A. A. ....67  
 Voronina E. S. ....548  
 Yanshole L. V. ....333  
 Yanshole V. V. ....333  
 Yarullina D. R. ....172  
 Zelentsova E. A. ....333  
 Zheglo D. G. ....548  
 Zhuravlev A. M. ....532
- Абай Ж. С. ....60, 441  
 Абдуллаев С. А. ....310, 659  
 Абдуллин Т. И. ....169, 170,  
 337, 382, 647  
 Абдулхаков С. Р. ....283, 574  
 Абдурахманова М. М. ....457  
 Абрамова А. С. ....62  
 Авдалян А. М. ....630  
 Авданина Д. А. ....184, 526  
 Авдонина Е. Д. ....399  
 Агладзе К. И. ....78, 314, 346  
 Адамовская А. В. ....3  
 Адонина С. Н. ....459  
 Азарян А. Д. ....587  
 Аитова А. А. ....64, 78  
 Акатова Е. В. ....195  
 Акберова Н. И. ....14  
 Акимкин В. Г. ....29, 44, 415, 444  
 Акматова Ж. К. ....414  
 Аксенов А. С. ....197, 290  
 Аксенова Д. С. ....4  
 Аксенова М. С. ....65  
 Аксенов-Грибанов Д. В. ....143, 162,  
 264, 292  
 Акулиничев С. В. ....323  
 Аладьев С. Д. ....460  
 Александрова Л. А. ....184  
 Алексеева Л. А. ....461, 682  
 Алёхин А. А. ....412  
 Алифанов В. В. ....680  
 Алкалаева Е. З. ....480, 520  
 Алрхмун С. ....5  
 Алферов С. В. ....76, 273  
 Алхираенко Д. А. ....68  
 Альховский С. В. ....405  
 Альшевская А. А. ....5  
 Америк А. Ю. ....207  
 Амерханова С. К. ....462, 571  
 Амстиславский С. И. ....374  
 Андреев Я. А. ....545, 689
- Андреева И. С. ....239, 597  
 Андреева-Ковалевская Ж. И. ....173  
 Андрюхова Е. С. ....680  
 Анисименко М. С. ....92  
 Анискин Д. А. ....694  
 Антошина Д. В. ....182  
 Аралов А. В. ....421  
 Арамова О. Ю. ....685  
 Арипов В. С. ....69, 583  
 Арляпов В. А. ....277  
 Арсеньев А. С. ....561  
 Артемова Э. А. ....399  
 Артемьева А. С. ....632  
 Артюхов В. Г. ....365  
 Артюшин И. В. ....424  
 Архипов С. А. ....679  
 Асанов М. А. ....463  
 Астахова Е. М. ....597  
 Асташонок А. Н. ....401  
 Асыбалиева Н. А. ....414  
 Аулова К. С. ....465  
 Аутеншлюс А. И. ....679  
 Афанасьев С. Г. ....544  
 Афонников Д. А. ....21, 35  
 Ахадов Т. А. ....398  
 Ахмадуллина Ю. Р. ....51  
 Ахмедов А. Д. ....535  
 Бабаев А. А. ....595, 620  
 Бабич П. И. ....312  
 Бабошко Д. А. ....403  
 Бабышкина Н. Н. ....516  
 Багаева Д. И. ....467  
 Багнюкова Д. А. ....72  
 Багрова О. Е. ....313  
 Баженов М. А. ....572  
 Баженов С. В. ....74, 724  
 Баженова Е. А. ....439  
 Базовкина Д. В. ....459, 617, 672  
 Байчурина И. А. ....469  
 Баклагина С. П. ....76  
 Бакланов И. Н. ....471  
 Бакулина А. Ю. ....392  
 Бакуменко С. С. ....78  
 Балабова Д. В. ....82, 302  
 Балалаева И. В. ....320  
 Баландин С. В. ....182  
 Балахонова Е. А. ....525  
 Балдов Д. А. ....369  
 Балтынк Г. ....701  
 Балькова А. Н. ....473  
 Баранова О. А. ....303  
 Баранова С. В. ....224  
 Барашкова И. И. ....368  
 Барлев Н. А. ....719  
 Бармак С. М. ....475  
 Барчуков В. Г. ....375  
 Баскаков С. А. ....171  
 Басманов Д. В. ....213
- Батищев О. В. ....325  
 Батса М. ....517  
 Бауэр И. А. ....476  
 Бегинязова О. П. ....477  
 Безпрозванный И. Б. ....637, 701, 703  
 Безруков А. С. ....80  
 Безуглова О. С. ....685  
 Бекболотов А. А. ....414  
 Белан Б. Д. ....597  
 Белаш Е. А. ....82  
 Беленинова И. А. ....630  
 Бельнская С. В. ....82, 84, 238,  
 302, 704  
 Белобородов Е. А. ....629  
 Белов А. Н. ....84  
 Белов Д. А. ....86  
 Белов С. В. ....422  
 Белова А. М. ....213  
 Белова Е. В. ....313, 384  
 Беловежец Т. Н. ....457, 712  
 Белоусов А. С. ....566  
 Бельшенко А. Ю. ....143, 162, 292  
 Бельдия Е. А. ....355, 357  
 Бережной А. К. ....314  
 Березовская М. Ю. ....87  
 Берсенева А. А. ....318, 359, 478  
 Беспярых Д. А. ....564  
 Бизяев Н. С. ....480  
 Бирулина Ю. Г. ....481  
 Бирюков М. М. ....482  
 Бирючкова П. Д. ....88  
 Благодатских К. А. ....103, 690  
 Бобков Г. А. ....517  
 Боброва Л. А. ....7  
 Богатова К. С. ....598  
 Богачихин Д. А. ....90  
 Богданов А. А. ....344  
 Богданов Ан. А. ....344  
 Богданов М. В. ....14, 205, 647  
 Богданова Е. А. ....8  
 Богомольная Л. М. ....717  
 Боднев С. А. ....425, 483  
 Бойко А. С. ....580  
 Бойцов В. М. ....397  
 Бокова У. А. ....680  
 Болдырев Н. Д. ....425, 483  
 Большаков А. Д. ....397, 210  
 Бондарь А. А. ....238  
 Боргоякова М. Б. ....342, 343, 583  
 Борисевич С. С. ....706  
 Борисова М. А. ....92  
 Борисова Н. И. ....29  
 Бороновский С. Е. ....351  
 Бортникова В. А. ....118  
 Бочаров Э. В. ....561  
 Бочкарева М. Д. ....94  
 Бояринцев В. В. ....116  
 Брагин К. А. ....96

Брагина О. Д. ....	686	Волкова М. В. ....	116	Гольшев В. М. ....	324
Брегадзе В. И. ....	345	Волкова Н. В. ....	69, 583	Гольдберг В. М. ....	368
Бровко Е. С. ....	98	Вологин С. Г. ....	202	Гончаров Н. В. ....	471
Бровко Ф. А. ....	173	Волосникова Е. А. ....	150, 583	Гончарук С. А. ....	352
Брус Т. В. ....	484	Волошина А. Д. ....	462, 571	Горбенко Д. А. ....	87
Брусенцев Е. И. ....	374	Волченко Н. Н. ....	121, 208	Горбунова Е. А. ....	129
Брызгунова О. Е. ....	655	Волынский П. Е. ....	561	Гордеев А. А. ....	587
Брюшкова Е. А. ....	175	Воробьев И. И. ....	122	Гордеева Т. Л. ....	267
Бубнов Д. М. ....	255	Воробьев Р. С. ....	503, 727	Горин К. В. ....	225
Бубнова А. Н. ....	12	Воробьева Е. Е. ....	118	Горина С. С. ....	130, 676
Буйко Е. Е. ....	481	Воробьева Е. С. ....	310, 659	Горислав А. А. ....	132
Булатова Л. Ф. ....	205, 647	Воробьева М. М. ....	136	Горленко Е. С. ....	160
Булгаков Н. А. ....	728	Воробьева Н. Ю. ....	375	Городничев Р. Б. ....	564
Булгакова А. Е. ....	486	Ворона К. А. ....	119, 305	Горчакова В. А. ....	134
Булыгин А. С. ....	683	Ворона С. В. ....	654	Горшкова А. А. ....	506
Булыгина Е. А. ....	666	Воронина Е. П. ....	60	Горюнова О. В. ....	586
Булычева Ю. И. ....	405	Воронкова О. В. ....	481	Гостева Т. А. ....	409
Бульмакова Д. С. ....	254	Ворошилин Р. А. ....	120	Готовцев П. М. ....	65, 114, 262
Бунева В. Н. ....	525, 582	Вохтанцев И. П. ....	160, 656	Готфрид Л. Г. ....	411
Буракова А. А. ....	487	Выборная Т. В. ....	255	Гошина А. Д. ....	436
Буренина О. Ю. ....	489	Выпова Е. Р. ....	318, 359, 478	Гречкин А. Н. ....	130, 676
Бурняшева А. О. ....	491	Вяткина К. В. ....	54	Гречко В. М. ....	136
Буслаева Е. А. ....	100	Вяхирева Ю. В. ....	552	Григорьев Е. Г. ....	188
Бусов И. Д. ....	159	Гавриленко Т. А. ....	21	Григорьев Я. А. ....	508
Бусыгина Ю. С. ....	230	Гаврилов К. А. ....	555	Григорьева А. Е. ....	714
Бутенко А. М. ....	405	Гавриш М. С. ....	595, 620, 653	Григорьева Т. А. ....	508, 537, 654
Бутова К. А. ....	316, 386	Гайдученко Е. С. ....	578	Григорьева Т. В. ....	283, 574, 666
Быков А. Г. ....	125, 171	Гаптулбарова К. А. ....	501, 513	Григорьева Э. В. ....	379, 460
Быков А. С. ....	317	Гарагуля Д. А. ....	227	Гринвальд В. М. ....	509
Бычкова О. В. ....	102	Гаранин А. Ю. ....	92	Гринченко А. В. ....	566
Вагнер В. Д. ....	363	Гарибян Ц. С. ....	62	Грицкова А. В. ....	398
Валеева Л. Р. ....	662	Гарифуллин Р. ....	169, 337	Гричик Е. Л. ....	265
Вараксин Н. А. ....	679	Гаськова Е. Д. ....	705	Губейко А. С. ....	136
Васильев Г. В. ....	21	Гасюк О. А. ....	121	Гузов С. А. ....	401
Васильева Г. В. ....	492	Гашникова М. П. ....	414	Гулая В. С. ....	530
Вахрушева А. В. ....	103	Гашникова Н. М. ....	403, 411, 414, 428, 432	Гуща В. В. ....	230
Вахрушева Е. П. ....	390	Гаямова Е. А. ....	122	Давидюк Ю. Н. ....	678
Вдовина Ю. А. ....	493	Генаев М. А. ....	21, 159	Давыдова М. П. ....	157
Вдовиченко Е. В. ....	107	Георгиев П. Г. ....	477	Дагбаев М. Д. ....	665
Ведерникова В. О. ....	494	Герасимова С. В. ....	159	Дайюб Т. ....	206
Ведунова М. В. ....	381, 653, 673, 681	Геращенко Т. С. ....	686, 503, 726	Даниленко А. В. ....	392
Вейко Н. Н. ....	639, 650	Гервас П. А. ....	535, 726	Даниленко Е. Д. ....	150
Веремченко В. С. ....	109	Германова М. А. ....	124	Данилов М. Р. ....	157
Вершинина С. О. ....	495	Гефтер С. Д. ....	320	Данилова Ю. В. ....	260
Веселовский В. А. ....	564	Гидазиева З. Е. ....	504	Дарнотук Е. С. ....	303
Викторина О. Е. ....	111	Гисич А. В. ....	322	Дауди Д. И. ....	138
Виллерт А. Б. ....	567	Гладких А. С. ....	424	Даянова Л. К. ....	122
Винокуров А. Ю. ....	631	Гладчук А. С. ....	340	Девяткин В. А. ....	510
Винокуров М. А. ....	112	Гладышева А. А. ....	407	Дедков В. Г. ....	175, 424
Вихлянов И. В. ....	630	Гладышева А. В. ....	407, 435	Деменков П. С. ....	43
Вихорев А. В. ....	159	Глухов С. И. ....	323	Дементьев Д. А. ....	134
Вишневская М. В. ....	114	Гоглова А. В. ....	125	Демиденко Д. В. ....	140
Вишнякова С. В. ....	499	Головко С. Д. ....	127	Демина Г. Р. ....	467
Власенко Н. В. ....	406	Головнева Е. С. ....	377	Демкин В. П. ....	331, 353, 390, 391
Власенкова Р. А. ....	14	Голосова Н. Н. ....	505	Дениева З. Г. ....	325
Власова А. А. ....	143, 264	Голубева А. Г. ....	415	Денисов Е. В. ....	58, 503, 680, 727
Власова А. В. ....	115	Голубева И. С. ....	586	Дербенёва А. С. ....	510
Водопьянова Т. А. ....	587			Деревянко А. О. ....	306

- Дерина Д. С. ....141  
 Дерюшева Е. И. ....7, 204  
 Деулин И. Ю. ....412, 509, 546  
 Джалилова Д. Ш. ....511  
 Джекебеков К. К. ....60  
 Джонстон С. А. ....630  
 Джугашвили Е. И. ....512  
 Джуманазарова Х. О. ....289  
 Дзагурова Т. К. ....405  
 Дзантиев Б. Б. ....251  
 Дмитриева М. А. ....144  
 Дмитриева М. Е. ....143, 162, 292  
 Дмитриенко Е. В. ....232, 476, 486  
 Добрынина Е. А. ....326  
 Добрякова Н. В. ....145  
 Добыш О. И. ....487  
 Довыденко И. С. ....633  
 Долгашева Д. С. ....513  
 Долгова А. С. ....175  
 Должикова О. А. ....515  
 Дольский А. А. ....68  
 Донина С. А. ....235  
 Донцова О. А. ....489, 565  
 Доронин А. Н. ....587  
 Доценко А. С. ....146  
 Дроздова П. Б. ....665  
 Дронова Т. А. ....516  
 Друзяка А. В. ....419  
 Дубовицкий Н. А. ....419  
 Дубовиченко М. В. ....517  
 Дудников М. В. ....519  
 Духинова М. С. ....495  
 Дьякова Ю. А. ....25  
 Евгенов И. В. ....56  
 Евдокимов И. Ю. ....147  
 Евменов К. С. ....480, 520  
 Евсеев И. Д. ....328  
 Евстифеев Е. А. ....444  
 Евтушенко Е. А. ....453  
 Егоров А. Е. ....590  
 Егорова А. А. ....159  
 Егорова Д. О. ....23  
 Егорова Е. А. ....149  
 Егорова Т. В. ....480  
 Екушов В. Е. ....414  
 Елизарьев Н. А. ....521  
 Елизова К. Д. ....523  
 Елисеев И. Е. ....18, 211  
 Елфимов К. А. ....432  
 Ельчанинов В. В. ....84, 302  
 Енькова Е. В. ....37  
 Епанчинцева А. В. ....129  
 Епишкина Ю. М. ....281  
 Ермаков Е. А. ....525, 582  
 Ермаков М. С. ....540  
 Ермоленко А. А. ....56  
 Ермолюк А. А. ....526  
 Ерошенко Г. А. ....473  
 Ершова Е. С. ....639, 650  
 Есина Т. И. ....150  
 Есипов Р. С. ....204  
 Еспембетов Б. А. ....60, 441  
 Есьман А. С. ....112, 415, 657  
 Ефремов Р. Г. ....17, 358, 561  
 Ефремов Ю. М. ....330  
 Жаглин Д. А. ....527, 645  
 Жарков Д. О. ....728  
 Жгун А. А. ....184, 526  
 Жданов Д. Д. ....145  
 Желанкин А. В. ....529  
 Жеравин А. А. ....379  
 Жердев А. В. ....251  
 Житнюк Ю. В. ....31  
 Жменя В. М. ....530, 626  
 Жолобова О. О. ....151  
 Жукова Ю. В. ....5  
 Жуковская А. А. ....331  
 Забелина С. А. ....197  
 Забродская Я. А. ....235  
 Завадовский К. В. ....390, 391  
 Заварзина Я. И. ....17  
 Завриев С. К. ....249  
 Загитова Р. И. ....153  
 Загрядская Ю. А. ....533, 561  
 Зайковская А. В. ....68, 425  
 Зайцева Ю. В. ....332  
 Закревский Д. Э. ....482  
 Залевский А. О. ....18  
 Замятина А. В. ....173  
 Зарайский А. Г. ....541  
 Зарубин А. А. ....726  
 Зарубин В. Н. ....312  
 Засухина Г. Д. ....659  
 Захаренко А. Л. ....553  
 Захаржевская Н. Б. ....574  
 Захаркина А. Д. ....535  
 Захаров З. В. ....154  
 Захарова Л. Я. ....462  
 Зацепин Т. С. ....489  
 Здерева Е. А. ....513, 536  
 Зелинский А. А. ....646  
 Зенина А. Д. ....537  
 Зенинская Н. А. ....156  
 Зенкова М. А. ....461, 682  
 Зенченко А. А. ....418  
 Зернов Н. И. ....538  
 Зинченко Н. Д. ....540  
 Зияев Я. С. ....289  
 Злотников И. Д. ....157  
 Змитриченко Ю. Г. ....697  
 Золин В. В. ....409  
 Золотухина Н. С. ....416  
 Зоров И. Н. ....146  
 Зубрицкий А. В. ....12  
 Зурина И. М. ....330  
 Зыбин Д. И. ....346  
 Зыкова В. А. ....326  
 Зыкова Т. Е. ....159  
 Ибрагимов М. К. ....501, 513,  
 536, 687, 695  
 Ибрагимов С. М. ....21  
 Иванская Е. В. ....160  
 Иванисенко В. А. ....43  
 Иванова А. О. ....18  
 Иванова Э. Д. ....541  
 Иванюк Е. Е. ....680  
 Ивин Ю. Ю. ....306  
 Ивлева Е. К. ....425, 448  
 Ивонцин Л. А. ....334  
 Игнатов К. Б. ....92  
 Игонина Т. Н. ....374  
 Иконникова А. Ю. ....214  
 Ильин Г. Д. ....665  
 Ильина Л. А. ....41  
 Ильичёв А. А. ....69, 643, 708  
 Ильчибаева Т. В. ....617  
 Имидоева Н. А. ....162  
 Иншакова А. М. ....303  
 Ионов Н. С. ....20  
 Иркитова А. Н. ....147  
 Исабек А. У. ....723  
 Исаев А. А. ....103  
 Исаева А. А. ....583  
 Исакова-Сивак И. Н. ....235, 430,  
 436, 439, 450, 454  
 Ишкаева Р. А. ....169, 337, 382  
 Ищук С. А. ....163, 165, 308  
 Кабанов Д. И. ....375  
 Кабве Э. ....678  
 Кабиева Ш. Ш. ....28  
 Кабилов М. Р. ....239  
 Кабилов М. Р. ....419, 631  
 Казакова А. В. ....163, 165, 308  
 Казакова А. Д. ....544  
 Казакова Е. О. ....544, 567  
 Казаринов К. Д. ....303  
 Казачкова В. С. ....167  
 Калабушева Е. П. ....720  
 Калаева Е. А. ....365  
 Калинин А. И. ....314  
 Калинин С. А. ....694  
 Калинин Н. О. ....249  
 Калиновский А. П. ....545  
 Калиткина К. А. ....41  
 Калнина Я. К. ....340  
 Калымбетов А. А. ....412, 546  
 Калюжная Л. И. ....243, 268  
 Камалов М. И. ....169, 170, 337, 647  
 Каменева Л. В. ....639, 650  
 Камионская А. М. ....12  
 Камынина А. В. ....561  
 Канарская М. А. ....341  
 Каныгина А. В. ....34  
 Капрельянц А. С. ....467

- Капустянская М. А.....171  
 Каратовская А. П.....173  
 Карбышев М. С. ....587  
 Каретников Д. И. ....21  
 Карнаушкина М. А.....657  
 Карпенко А. Е.....174  
 Карпенко Л. И.....69, 242, 272, 342,  
 343, 570, 643, 708  
 Карпов А. Е.....632  
 Карпова Е. В. ....418, 421  
 Карпова О. В.....453  
 Карташов М. Ю.....183, 443, 597  
 Карцева А. С.....156, 642  
 Касенов М. М. ....60  
 Кечин А. А. ....557  
 Кжышковска Ю. Г. ....544  
 Ким А. В.....57  
 Ким Д. В.....728  
 Кипень В. Н. ....487  
 Киргизов К. И.....694  
 Кириченко А. Д. ....175  
 Киркин Р. С. ....209  
 Киров И. В. ....22, 115, 519  
 Кирьянова Т. Д.....23  
 Кисаков Д. Н.....342, 343  
 Кисакова Л. А. ....342, 343  
 Кисык Т. А. ....723  
 Китова А. Е. ....125  
 Киямова Р. Г. ....14, 170, 205, 647  
 Кленова Н. А.....125, 167, 298  
 Клименко А. И.....27, 33  
 Клименко В. В. ....344  
 Клименко М. А. ....345  
 Климина К. М.....564  
 Клинов Д. В. ....213  
 Клушина Н. В. ....328  
 Князев Н. А.....344  
 Коваленко С. Г. ....346  
 Коваленко С. П. ....92, 535  
 Коваль А. Д.....84  
 Коваль А. П.....31, 24, 690  
 Коваль О. А.....457, 482  
 Ковальчук М. В.....25  
 Ковнир С. В.....122  
 Ковпак А. А.....306  
 Ковтун О. Г.....615  
 Кожабергенов Н. С.....723  
 Кожевникова О. С.....510  
 Козак С. С. ....141  
 Козел Н. В.....361  
 Козлов В. В. ....535  
 Козлов С. А. ....689  
 Козлова А. С. ....14  
 Козлова Т. А.....549  
 Козлова Т. Н.....90, 179  
 Козлова Ю. Н.....505  
 Козловская Л. И. ..107, 418, 421, 455  
 Колесников А. А.....29  
 Колесникова Е. А.....721  
 Колесникова И. В. ....574  
 Колмогоров И. М.....193  
 Колодницкий А. С.....20  
 Колодязная В. С.....241  
 Коломиец Л. А. ....567  
 Колосов П. В.....82  
 Колосова Е. А. ....111, 705  
 Колосова Н. Г.....510, 641, 649  
 Колосова Н. П.....392  
 Колотыгин И. О.....419  
 Колпакова Е. С.....418, 421, 517  
 Колтышева П. И. ....630  
 Кольцов А. Ю. ....422, 423  
 Кольцова Г. С.....423  
 Командин Д. С. ....56  
 Комарова Л. Н.....318, 359, 478  
 Комарова Т. В.....293  
 Комбарова Т. И. ....156  
 Компанец И. Ю.....181  
 Комышев Е. Г.....159  
 Кондаурова Е. М.....641  
 Кондратенко А. А. ....243, 268  
 Кондратенко В. Д. ....348  
 Кондратьев В. М.....397  
 Кондрашева Л. Ю.....29  
 Конев В. П.....363  
 Коневега А. Л. ....396  
 Кониная Д. О. ....552  
 Кононова Д. В.....182  
 Кононова П. А. ....383  
 Коношенко М. Ю.....655  
 Конькова Т. В. ....328  
 Копбаева А. А.....723  
 Кополева Е. А. ....350  
 Коптюг И. В.....269  
 Копылова В. С. ....351  
 Копылова Г. В. ....355, 357, 386  
 Копытова Д. В.....493  
 Кордонская Ю. В.....25  
 Коренская А. Е.....27  
 Корнаков И. А.....94, 100, 280  
 Корнеев Е. В. ....424  
 Корниенко И. В.....685  
 Корниенко М. А.....564  
 Корниенко Т. Е.....553  
 Корнилов Д. А. ....561  
 Корнилов Ф. Д. ....352  
 Коробейникова А. В. ....28  
 Короленя В. А.....555  
 Королькова Ю. В. ....545  
 Короткова А. М.....159  
 Корчагин В. К. ....657  
 Коршунов А. С. ....363  
 Корюков М. А.....557  
 Корякин С. Н. ....317  
 Косенко А. В.....353  
 Косенко М. Г.....28  
 Косс В. А.....230  
 Костенко В. В. ....230  
 Костюк С. В. ....639, 650  
 Котенева П. И. ....330  
 Котихина Е. Е. ....354  
 Котлов М. И. ....219  
 Котловская Л. Ю.....331  
 Котов И. А.....29  
 Котова А. Д. ....31  
 Кочетков О. А. ....375  
 Кочетов А. В. ....21  
 Кочурова А. М. ....355, 357, 386, 605  
 Кошелева Н. В. ....330  
 Кошкин Ф. А.....58  
 Коэпель И.....159  
 Краевая О. А. ....639, 650  
 Красавин М. Ю.....694  
 Красильников И. В.....103  
 Кривошапкина Е. Ф. ....144, 622  
 Кривошеина Е. И.....183, 443  
 Кригер Д. В.....492  
 Кропачева Н. О.....559  
 Кропачев А. И. ....33  
 Крутько С. А. ....422  
 Крысько Д. В. ....381, 673, 681  
 Крючков Н. А.....103  
 Куанышева К. А.....503  
 Кудина М. Д. ....255  
 Кудров Г. А.....425, 448  
 Кудрявцев А. В. ....103  
 Кудрявцев И. В. ....436  
 Кудрявцева А. А. ....668  
 Кудряшова Е. В. ...145, 157, 193, 287  
 Кузин С. Н.....406  
 Кузнецов А. С. ....17, 358  
 Кузнецова Е. А.....323  
 Кузьмин А. И. ....403  
 Кузьминых А. А. ....308  
 Кузьмичев П. К.....561  
 Куклина С. А.....721  
 Кукушкина В. И.....184  
 Кукушкина Т. А. ....438  
 Кулаков М. В.....186  
 Кулемзин С. В.....457, 712  
 Кулигина Е. В. ....540, 651  
 Куликов А. В.....459, 672  
 Куликова Е. А.....459, 672  
 Кумейко В. В.....530, 566, 626  
 Кумлен Й.....159  
 Куприн А. В. ....109  
 Куприянова О. В.....666  
 Купрюшкин М. С.....633  
 Купцов Н. С. ....564  
 Купцова П. С.....318, 359, 478  
 Курганский И. С. ....188  
 Курилин В. В. ....683  
 Курилов И. В.....119, 305  
 Курочкина А. О. ....565

- Курьянчик Т. Г. ....361  
 Курятников К. Н. ....363  
 Кухарский М. С. ....634  
 Кушлинский Н. Е. ....31  
 Лаврик О. И. ....553  
 Лаврова Д. Г. ....189  
 Лаврова Т. В. ....277  
 Лазарев А. Ф. ....630  
 Лазарев В. Н. ....34  
 Лазукин А. А. ....121  
 Лайков А. В. ....337, 382  
 Лактионов П. П. ....655  
 Лактионова А. В. ....326  
 Ланских Д. В. ....471, 566, 626  
 Ланцова Н. В. ....676  
 Лапа С. А. ....499, 715  
 Лаптев Г. Ю. ....41  
 Ларионов Д. И. ....206  
 Ларионова И. В. ....58, 544, 567  
 Ларцева Л. О. ....186  
 Латипова А. Д. ....191  
 Латыпов В. Ф. ....94, 100, 280  
 Латыпова Д. К. ....34  
 Лачынова М. Е. ....35  
 Лашин С. А. ....27, 33  
 Лебедев И. Н. ....246  
 Лебедев Т. Д. ....494  
 Лебедева С. А. ....107  
 Левчук А. А. ....233  
 Легоцкий С. А. ....587  
 Ле-Дейген И. М. ....193  
 Леонова Т. И. ....195  
 Лепехова С. А. ....188  
 Лепикаш Р. В. ....277  
 Лесовой Д. М. ....561  
 Летаров А. В. ....227  
 Липницкая М. А. ....568  
 Липскеров Ф. А. ....293  
 Литвинов Н. В. ....365  
 Литвинова В. Р. ....570  
 Литвинова М. М. ....657  
 Литвяков Н. В. ....513, 695  
 Литти Ю. В. ....88  
 Литус Е. А. ....7  
 Лобанова И. Е. ....438  
 Ловдина Т. И. ....197, 199  
 Логашина Ю. А. ....545  
 Логинова А. М. ....419  
 Локтев В. Б. ....183, 706  
 Ломерт Е. В. ....492  
 Ломзов А. А. ....232, 324, 341, 643  
 Лопатин С. А. ....526  
 Лопатникова Ю. А. ....5  
 Лузина О. А. ....553  
 Лукин А. Ю. ....72  
 Лукьянов К. А. ....506  
 Лукьянова А. Л. ....207  
 Лутфуллин М. Т. ....201, 202  
 Лутфуллина Г. Ф. ....202, 223  
 Лыкошин Д. Д. ....204  
 Любина А. П. ....571  
 Лямина С. В. ....574  
 Лянгузов А. Ю. ....366  
 Ляшков П. О. ....124  
 Мазуркова Н. А. ....438  
 Майорова К. А. ....290  
 Макаренко И. А. ....205, 647  
 Макаров Д. А. ....184  
 Макарова М. А. ....642  
 Маклаков Д. В. ....138  
 Максименко Л. В. ....414, 428  
 Максименко О. Г. ....477  
 Максимкин А. В. ....206  
 Максимова Н. Р. ....246  
 Максютков Р. А. ....425  
 Малинина Д. К. ....230  
 Малкова А. В. ....147  
 Малова Е. А. ....572  
 Малыгина Е. В. ....143  
 Малыгина Н. М. ....366  
 Мальшев Б. С. ....597  
 Мальцев В. П. ....322  
 Мамаева П. В. ....193  
 Манжурцев А. В. ....398  
 Манухов И. В. ....74, 668, 724  
 Манухова Т. И. ....453  
 Марданова А. М. ....201, 202,  
 223, 584  
 Маркелова М. И. ....283, 469, 574, 666  
 Маркин Н. В. ....249  
 Маркина Т. А. ....405  
 Мартиросян Л. Ю. ....207, 216,  
 275, 368  
 Мартиросян Ю. Ц. ....216, 275, 368  
 Мартынова В. В. ....323  
 Мартынова Н. Ю. ....541  
 Марченкова М. А. ....25  
 Марьин М. А. ....156, 642  
 Маслов А. А. ....597, 576  
 Матвеев А. Л. ....505  
 Матвеева А. Г. ....213  
 Матвеева А. К. ....5, 68  
 Матушкин Ю. Г. ....27  
 Матюшенко А. М. ....355, 357, 605  
 Матюшенко В. А. ....436, 450  
 Махамбетов Э. М. ....120  
 Машков Е. И. ....578  
 Машковцева Е. В. ....334  
 Меднова И. А. ....580  
 Меженская Д. А. ....430  
 Меламуд М. М. ....525, 582  
 Мелентьева Д. М. ....538  
 Мелисбек А. М. ....723  
 Мелконян К. К. ....208  
 Мельникова А. А. ....209, 369  
 Мельничук С. В. ....390, 391  
 Меркулов П. Ю. ....519  
 Меркульева Ю. А. ....210, 222, 583  
 Мечетина Л. В. ....69  
 Мещанинова М. И. ....515, 559  
 Микушина А. Д. ....211  
 Милахина Е. В. ....482  
 Милейко А. Г. ....592  
 Милюкова Н. А. ....635  
 Минеев К. С. ....352  
 Минибаева Ф. В. ....237  
 Минина В. И. ....463  
 Минкина Т. М. ....174  
 Миннуллина Л. Ф. ....584  
 Миргородская А. Б. ....462  
 Мионов В. Ф. ....382, 571  
 Мионов К. О. ....415, 657  
 Мионова М. В. ....586  
 Мионова Н. Л. ....207, 461, 682  
 Мирошниченко С. М. ....416  
 Мисорин А. К. ....587  
 Митрошина Е. В. ....595, 653  
 Митрухина О. Б. ....660  
 Митько Т. В. ....213  
 Мифтахов Р. А. ....214, 294, 300  
 Михайлов В. А. ....462  
 Михайлова Е. С. ....679  
 Михеева Э. Р. ....88  
 Мишарина Е. А. ....264  
 Можаровская Л. В. ....588  
 Моисеева А. В. ....215  
 Моисеева О. Э. ....201  
 Моисеенко В. М. ....344  
 Моллаева М. Р. ....345  
 Молобекова К. А. ....589, 641  
 Молочков Н. В. ....590  
 Молчанов В. Г. ....590  
 Молчанов М. В. ....317  
 Моргунова М. М. ....264  
 Мордвинова Е. Д. ....69, 431  
 Морева В. О. ....371  
 Морозов А. Н. ....154  
 Морозов В. В. ....651  
 Морозова В. В. ....505  
 Морозова Е. П. ....372  
 Мосина Л. Д. ....592  
 Москалюк В. С. ....672  
 Моторина А. О. ....595  
 Моторов У. Т. ....414  
 Мотякин М. В. ....368  
 Мошкин А. Д. ....597  
 Муллакаева А. И. ....598  
 Муллахметова А. Ф. ....666  
 Мурашкин Д. Е. ....302  
 Мусатова О. Е. ....489  
 Мухамедшина Я. О. ....469  
 Мухами Н. Н. ....723  
 Муханова М. А. ....601  
 Мухина И. В. ....354



Мухтарова Л. Ш. ....	130	Омигов В. В. ....	448	Пожарский А. А. ....	608
Мягкова Е. Р. ....	216, 275	Онвумере М. К. ....	434	Полежаева В. А. ....	397
Мячина Т. А. ....	316, 386	Онищенко М. С. ....	612	Полетаева Д. А. ....	388
Набиев С. Р. ....	357	Онян А. В. ....	615	Полещук Н. Н. ....	401
Нагель А. С. ....	173	Орешко А. С. ....	617	Политко М. О. ....	379, 460
Назарова Е. А. ....	288	Орлова Н. А. ....	122	Полозова М. И. ....	701
Назарова Е. Л. ....	576	Орынбаев М. Б. ....	723	Полосков А. И. ....	268
Найденова Е. В. ....	183	Осипов А. А. ....	375	Полховская Е. С. ....	635
Наквасина М. А. ....	365	Осипов А. Н. ....	375	Поляков Н. Э. ....	383
Налимова Т. М. ....	414	Осипов Г. В. ....	354	Помазной М. Ю. ....	92
Нарматова Э. Б. ....	414	Осипова З. М. ....	153	Помулев В. А. ....	412
Нарциссов Я. Р. ....	334, 351	Осипова И. П. ....	403, 414	Понаморева О. Н. ....	189
Науменко В. С. ....	617, 641	Оскорбин И. П. ....	286, 618	Понасенко А. В. ....	463, 670
Наумова Д. А. ....	219	Ословский В. Е. ....	418	Пономарев А. С. ....	504
Нащекин А. В. ....	268	Осмаков Д. И. ....	689	Пономарева А. А. ....	726
Невинский Г. А. ....	181, 434, 465, 525, 582, 623, 699, 710	Остальцев И. А. ....	655	Пономарева Е. С. ....	41
Невская К. В. ....	513	Остапова Т. С. ....	414, 428	Пономарева Т. И. ....	317
Недурубов А. А. ....	694	Остроушко А. А. ....	444	Попов Д. Ю. ....	631
Неклесова М. В. ....	602	Оськина О. П. ....	409	Попов М. А. ....	346
Немашкалова Е. Л. ....	204	Охальников А. Д. ....	620	Попова В. К. ....	232
Немтарёв А. В. ....	169, 170, 382	Охина А. А. ....	553	Попова Н. А. ....	553
Несмеянова В. Н. ....	583	Охлопкова О. В. ....	597, 678	Попонина Е. А. ....	96
Нестеров М. А. ....	21	Охрименко И. О. ....	533	Попугаева Е. А. ....	538
Нефедова А. А. ....	432	Охрименко И. С. ....	561	Поройков В. В. ....	20
Нефёдова В. В. ....	605	Павлов А. Д. ....	39	Поспелов А. Д. ....	320
Нефедьева Е. Э. ....	394	Павлюков М. С. ....	489	Правдивцев А. Н. ....	269
Нигматулина Л. Ш. ....	666	Панкова О. В. ....	503, 726	Прасолов В. С. ....	494
Никитин В. Н. ....	210, 222	Пантелеев Д. Ю. ....	520	Преснякова В. П. ....	330
Никитин Н. А. ....	453	Панюта А. С. ....	144, 622	Приставка Е. О. ....	233
Никитина Л. В. ....	357	Парамоник А. П. ....	623	Прозорова И. Ш. ....	191
Никитушкин В. Д. ....	467	Парщикова Ю. В. ....	230	Прокопенко П. И. ....	436
Никифоров К. А. ....	606	Патракова Е. А. ....	482	Прокопов Д. Ю. ....	718
Николаева А. А. ....	223	Патрушев М. В. ....	21	Просекина Е. А. ....	632
Николенко В. Н. ....	663	Патьшева М. Р. ....	544, 686	Проскурнина Е. В. ....	639, 650
Николин В. П. ....	553	Пашковская О. А. ....	379	Протопопова Е. В. ....	706
Никольская Е. Д. ....	345	Пельтек А. ....	350	Прохорова Д. В. ....	633
Никулич И. Ф. ....	510	Пенькова А. О. ....	530, 626	Проценко М. А. ....	438
Новиков В. Ю. ....	270, 590	Переверзев И. М. ....	633	Пудова Д. С. ....	202
Новикова Д. С. ....	608	Перельмутер В. М. ....	503, 680, 726	Пукаева Н. Е. ....	634
Новикова Л. М. ....	618	Переляева Е. В. ....	162, 292	Пунгин А. В. ....	186
Новицкая К. С. ....	492	Перик-Заводский Р. Ю. ....	5	Пустовалова М. В. ....	375
Новожилов Н. М. ....	590	Першина А. Г. ....	513	Пустогаров Н. А. ....	520
Новопашина Д. С. ....	160, 515, 570, 656	Петрова М. Г. ....	225	Путляева Л. В. ....	506
Новоселецкий В. Н. ....	8	Петрова Т. А. ....	366	Пчицкая Е. И. ....	637, 703
Нурпейсова А. С. ....	60, 441	Петрова Т. В. ....	34	Пшеничкина Ю. А. ....	438
Нуштаева А. А. ....	457, 540, 651, 695	Печенов П. Ю. ....	227	Пырников А. С. ....	635
Обернихин К. И. ....	37	Пешкова Д. А. ....	377	Пышная И. А. ....	129, 572
Овчинников Р. К. ....	634	Пивоварова А. В. ....	357	Пышный Д. В. ....	286, 324, 633
Овчинникова Т. В. ....	182	Пилипенко Ю. М. ....	144, 622	Пьянков Д. В. ....	58
Огурцов С. В. ....	469	Пипия С. О. ....	18	Пьянков О. В. ....	68, 425, 448
Одегова Е. И. ....	611	Писаревский Ю. В. ....	25	Пьянков С. А. ....	183, 425
Окотруб К. А. ....	374	Плеханова Ю. В. ....	167	Пюрвеев С. С. ....	484
Олейник Г. А. ....	224	Плотников К. О. ....	435	Рагад А. ....	337
Олейников П. Д. ....	230	Поварова Н. В. ....	506	Раева Н. Ф. ....	659
Омельченко А. В. ....	174	Погодина Е. С. ....	629	Разин С. В. ....	720
Омельченко А. Н. ....	374	Подгало Д. Д. ....	230	Рак А. Я. ....	235, 439
		Подлесных С. В. ....	630, 705	Ракина М. А. ....	567
		Подольская Е. П. ....	340	Раковская А. В. ....	637, 703

- Ранджан Р.....372  
 Рассабина А. Е.....237  
 Расторгуева Е. В.....629  
 Рахманина А. Е.....238  
 Ребус М. Е.....239  
 Ревва П. М.....43  
 Редькин Т. С.....381, 673, 681  
 Рекеда И. А. ....512  
 Решетиллов А. Н.....125, 167, 171, 298  
 Ржевская В. С. ....174  
 Ризванов А. А. ....504  
 Риккинен А. Д. ....124  
 Римская Б. А. ....78  
 Рихтер В. А. ....457, 651  
 Робустова С. Э. ....94, 100  
 Рогачев А. Д.....553  
 Рогозин М. М.....156  
 Рогозина Е. А.....241  
 Родионов Е. О.....503  
 Родионов И. В.....639, 650  
 Родионова З. С.....406  
 Родичева М. А.....290  
 Родный А. Я.....617, 641  
 Роев Г. В. ....44  
 Рожков О. А. ....403  
 Рожкова А. М.....146  
 Романенко Я. О.....156, 642  
 Романцова О. М.....694  
 Ромащенко А. В.....328  
 Рубель А. А.....646  
 Рубцов Ю. П. ....489  
 Рубцова М. П. ....489, 565  
 Рудакова А. А.....615  
 Рудакова Н. Л.....279  
 Руденко Л. Г. ....235, 430, 436, 454  
 Руденко Н. В. ....173  
 Руденко Т. В. ....331  
 Рудик А. В.....20  
 Рудницкая Е. А. ....491, 549  
 Рудомётов А. П. ....242, 570,  
 643, 708  
 Рудомётова Н. Б.....242, 272,  
 570, 643  
 Румянцева Ю. В.....510  
 Руснак М. В. ....243  
 Рыжиков А. Б.....392  
 Рысакова К. С. ....270  
 Рыченкова О. О.....645  
 Рябинина М. В.....646  
 Рябко А. К. ....156  
 Рябчикова Е. И.....651  
 Сабиров А. Х. ....587  
 Саввина М. Т.....246  
 Савельева А. В.....651  
 Савенкова Д. В.....170, 205, 647  
 Савина Е. Д. ....649  
 Савинова Е. А.....639, 650  
 Савинова О. С.....146  
 Савиновская Ю. И.....540, 651  
 Савицкая А. Г.....352  
 Савушкин М. А.....388  
 Савюк М. О.....381, 653, 673, 681  
 Сагайдак А.....608  
 Сагайдак А. В. ....654  
 Садикалиева С. О. ....60, 441  
 Садовая Я. О. ....586  
 Садыков А. А.....247  
 Саенко В. В. ....29  
 Сайткулова М. М.....655  
 Саковина Л. В.....160, 656  
 Саламайкина С. А. ....112, 415, 657  
 Салахиева Д. В. ....169, 337  
 Салахутдинов Н. Ф. ....272, 553  
 Салеева Д. В.....112, 310, 659  
 Салина Е. А.....21  
 Салихязнова А. Ф.....598, 660  
 Салихова Т. И.....382  
 Сальников О. Г.....269  
 Самарина С. А. ....661  
 Самарская В. О.....249  
 Самков А. А. ....121, 208  
 Самойлов А. Е. ....424  
 Самохвалов А. В.....251  
 Санина Н. А. ....388  
 Санникова А. В.....662  
 Санькова М. В.....663  
 Сарачина А. Е. ....665  
 Сафатов А. С.....239, 597  
 Сафронова А. С. ....193  
 Свиринов К. А. ....443  
 Свищевская Е. В.....204  
 Севостьянова К. С.....555  
 Седова Е. С. ....399  
 Седых С. Е. ....434, 623, 699, 710  
 Селезов С. Ю. ....444  
 Селиванов П. А. ....253  
 Селютин О. Ю. ....383  
 Семашко Т. В. ....167  
 Семенов Д. В. ....482, 540, 651  
 Семенова Е. В.....384  
 Семенова Н. А. ....398  
 Сенина А. М. ....574, 666  
 Сеничкина Д. А. ....94  
 Сенников С. В.....5, 683  
 Сенькова А. В. ....461  
 Сергеева Я. Э.....262  
 Серебрянникова К. В. ....251  
 Сиваев И. Б. ....345  
 Сивай М. В.....414, 428  
 Сидорова М. К.....720  
 Сикамов К. В. ....668  
 Силина М. В. ....511, 156, 642  
 Симонова Р. А.....316, 386  
 Сингх-Пальчевская Л.....46  
 Синецкий С. П. ....255, 267  
 Синетова М. А. ....153  
 Синицкая А. В. ....670  
 Синицкий М. Ю. ....670  
 Синицын А. П.....146  
 Синкина Т. В.....630  
 Синягина М. Н.....283, 574, 666  
 Сиунов А. В. ....173  
 Скоблов М. Ю.....552  
 Сковпин И. В. ....269  
 Скородумова Л. О.....34  
 Скотникова А. К. ....672  
 Скударнов С. Е. ....414, 428  
 Скуреева А. А. ....193  
 Славохотова А. А. ....306  
 Слепцова Е. Е. ....381, 673, 681  
 Слонимская Е. М.....516  
 Слотвицкий М. М.....314  
 Сметанина М. А. ....555  
 Смирнов Е. Ю.....719  
 Смирнова Е. О. ....676  
 Смолина А. В.....388  
 Смолярова Т. Е. ....372  
 Снытникова О. А.....649  
 Собко О. А. ....446  
 Сокол М. Б. ....345  
 Соколов Д. К.....379, 460  
 Соколова Л. О.....365  
 Соколова М. О. ....116  
 Сокольников Л. В. ....254  
 Солдатова Ю. В.....388, 477  
 Соловьев А. А.....62, 115, 519, 635  
 Соловьев В. В. ....587  
 Соловьева В. В. ....504  
 Соловьева Э. Ю.....303  
 Соловьянова Н. А.....239  
 Солодкий В. В. ....409  
 Солонин А. С. ....173  
 Соляникова Д. Р.....377  
 Сорокина Д. М.....677  
 Спарбер П. А. ....552  
 Сперанская А. С. ....424  
 Спеченкова Н. А. ....249  
 Спиридонова Е. В.....448  
 Спирин П. В.....494  
 Старикова М. С.....645  
 Старостин И. С. ....412  
 Сташевски З.....202  
 Стегний В. Н.....544  
 Степень М. Ю. ....694  
 Степанов Г. А.....525, 633  
 Степанова А. А.....255  
 Степанова Е. А. ....436, 439, 454  
 Степанова С. А. ....257  
 Степанюк М. А. ....678  
 Стефанова Н. А. ....549, 641  
 Столбунова К. А. ....678  
 Стрыгина К. В. ....159  
 Студеникина А. А.....679  
 Суворова В. В. ....258

Сугак Д. Е. ....	629	Тоцкий И. В. ....	601	Харькова А. С. ....	277
Сулейманова А. Д. ....	149, 254	Тошakov С. В. ....	21	Хасанов Т. А. ....	689
Султанкулова К. Т. ....	723	Трегубчак Т. В. ....	597	Хасанова Д. И. ....	279
Султанов Г. Э. ....	260	Трепакова А. И. ....	269	Хасаншина З. Р. ....	94, 100, 280
Супрун И. В. ....	208	Третьякова М. С. ....	680	Хафизов К. Ф. ....	29, 44, 444
Супрунова Т. П. ....	249	Троицкая О. С. ....	482	Хертиг К. ....	159
Супрунчук В. Е. ....	261	Трофименко А. В. ....	116	Хикель Ш. ....	159
Суровцев Н. В. ....	326, 374	Трошин П. А. ....	639, 650	Хлебова Л. П. ....	98
Сухер М. М. ....	422	Трушина Д. Б. ....	320	Хлесткина Е. К. ....	159
Сухинов Д. В. ....	262	Турнаев И. И. ....	35	Ховенер Я.-Б. ....	269
Сухов Б. Г. ....	328	Турубанова В. Д. ....	381, 673, 681	Хозов А. А. ....	255
Суюндукова А. Т. ....	390, 391	Тычинин Д. И. ....	8	Хозяинова А. А. ....	503
Сынбулатова Г. Э. ....	666	Тюлин А. А. ....	622	Холод Н. С. ....	422, 423
Сырым Н. С. ....	60	Тюменцев М. А. ....	549	Хоменко П. О. ....	51
Сысоева Е. В. ....	191	Ублинский М. В. ....	398	Хохлова А. Д. ....	316, 386
Сысоева М. А. ....	191	Удут В. В. ....	331, 353	Храмова В. Н. ....	394
Сычев И. А. ....	450	Узбекова О. Р. ....	270	Храмова Е. П. ....	438
Табачникова А. А. ....	208	Уласов И. В. ....	453, 694	Храмова Я. И. ....	394
Тагайев А. И. ....	723	Ульянов С. В. ....	720	Хрипко О. П. ....	412, 416, 509, 546
Тальянский М. Э. ....	249	Умаров Б. Р. ....	289	Хрипко Ю. И. ....	412, 509, 546
Тамкович С. Н. ....	512, 714	Унанян Л. С. ....	538	Хромова А. С. ....	690
Таранин А. В. ....	69	Унгуриян В. В. ....	392	Хромова Н. Ю. ....	281
Таранов О. С. ....	425, 448	Устюжанинова Л. В. ....	80, 127	Худокормов А. А. ....	121, 208
Тарасенко Т. А. ....	523	Ушкаленко Н. Д. ....	183, 242	Хуснуллина Л. Х. ....	283
Тарасов М. С. ....	510	Файзуллина Д. Р. ....	453, 694	Хуснутдинова Д. Р. ....	283, 574, 666
Тарасов С. Е. ....	298	Файнгольд И. И. ....	388	Цвеляя В. А. ....	78, 314
Тарасова А. С. ....	544	Фандо А. А. ....	242, 272	Цейликман Д. В. ....	56
Таратынова М. О. ....	134	Федин А. И. ....	303	Центалович Ю. П. ....	649
Татаринов Д. А. ....	571	Федина В. В. ....	273	Цепаева О. В. ....	382
Телегина Д. В. ....	491, 510, 649	Федоруцева Е. Ю. ....	632	Цибулина А. О. ....	353
Тельнова Т. Ю. ....	264	Филатова А. А. ....	682	Цибульников С. В. ....	453, 694
Тентлер Д. Г. ....	492	Филатова А. Ю. ....	552	Цыбко А. С. ....	568
Терехов С. С. ....	18	Филатова С. И. ....	275	Цыганов М. М. ....	501, 536, 687, 695
Терехова Н. В. ....	571	Филимонов А. С. ....	553	Цыденова И. А. ....	513, 695
Терёшина М. Б. ....	541	Филипенко М. Л. ....	286, 555, 557, 618	Цымбал С. А. ....	697
Терещенко В. П. ....	683	Филиппова Е. И. ....	438	Чайка Д. Д. ....	396
Терещенко Т. В. ....	265	Филиппова О. В. ....	206	Чеканов А. В. ....	303
Терновой В. А. ....	183, 597	Фильков Г. И. ....	116	Чекменев Э. Ю. ....	269
Тиванова Е. В. ....	29	Фирстова В. В. ....	156, 642	Червякова О. В. ....	723
Тикунова Н. В. ....	505	Фисенко П. В. ....	446	Чердынцева Н. В. ....	516, 535, 680, 686, 726
Тимашев П. С. ....	330, 694	Фишер М. С. ....	683	Черенко В. А. ....	699
Тимофеев В. И. ....	25	Флеер М. В. ....	403	Черкашина А. С. ....	415
Тимофеев М. А. ....	665	Флоринская В. С. ....	685	Черней И. С. ....	53
Тимофеева А. М. ....	434, 611, 710	Фоменко В. В. ....	272	Чернов В. Е. ....	268
Тимченко М. А. ....	317, 590	Фоменко М. В. ....	393	Чернов Ю. О. ....	646
Тихонов М. В. ....	477	Фролова А. А. ....	680, 686, 687	Черноносков А. А. ....	224
Тищенко Е. Д. ....	630	Фролова М. Е. ....	103	Чернышов Н. А. ....	481
Ткаченко А. А. ....	267	Фролова Ш. Р. ....	346	Чернюк Д. П. ....	701
Товпеко Д. В. ....	243, 268	Фурсова А. Ж. ....	510	Чечкова Н. А. ....	285
Токин Г. М. ....	452	Хабибрахманова В. Р. ....	237	Чигасова А. К. ....	375
Толичева О. А. ....	396	Хайбуллина С. Ф. ....	678	Чиграй М. Е. ....	703
Толмачева А. С. ....	434	Хайрова А. Ш. ....	526	Чимези К. И. ....	144
Толстова П. О. ....	633	Халиков М. Р. ....	414	Чиркина М. В. ....	345
Томилов А. А. ....	425	Халиуллова Г. И. ....	584	Чиркова В. Ю. ....	704
Топольницкий Е. Б. ....	503	Ханды М. Т. ....	109, 247	Чистякова А. К. ....	436, 454
Топоркова Я. Ю. ....	130, 676	Хантакова Ю. Н. ....	683	Чокмоморова У. З. ....	414
Торопыгин И. Ю. ....	480	Харченко А. М. ....	283	Чуб Е. В. ....	435, 443
Тотменин А. В. ....	403, 414, 428				

Чубаров А. С.....	286	Шефер Н. А.....	503	Щеголева А. А.....	503, 726, 727
Чудаков Д. М. ....	31	Шешукова Е. В. ....	293	Щеголькова В. О.....	302
Чудин А. А. ....	287	Шингарёва А. А.....	715	Щелконогов В. А.....	303
Чудинов А. В. ....	214, 294, 300, 499, 715	Шипелова А. В. ....	303	Щепкин Д. В.....	316, 355, 357, 386
Чуканов Н. В.....	269	Шиповалов А. В. ....	425, 448	Щербаков Д. Н.....	69, 82, 84, 111, 150, 210, 222, 238, 242, 272, 302, 431, 583, 704, 706
Шавронская Д. О.....	288	Шипунов М. В. ....	509, 546	Щербакова М. М. ....	481
Шагалеева О. Ю. ....	574	Ширманов М. В.....	147	Щербакова Н. С. ....	272
Шагимарданова Е. И.....	202	Широкова Е. Ю. ....	494	Щербакова С. А. ....	56
Шайтан А. К. ....	46	Широкова Л. С.....	197, 199	Щербина С. А. ....	78
Шакиров Е. В.....	662	Ширшикова Т. В. ....	717	Щербо Д. С. ....	31, 690
Шакирова Г. Ф. ....	574	Шитик Е. М.....	718	Эсметьева М. В.....	169
Шалик И. К. ....	718	Шитиков Е. А.....	564	Юдина Н. Ю. ....	90, 179
Шаманин В. А. ....	535	Шитикова Е. Ю.....	631	Юдкин Д. В.....	5, 68, 718
Шаньшин Д. В. ....	583, 705, 706, 707	Шишкин И. Ю. ....	294	Юдкина А. В.....	728
Шаповал А. И. ....	111, 630, 705, 707	Шишкова Д. К.....	670	Юзбашева Е. Ю.....	134
Шапрова О. Н. ....	707	Шкуратова М. А. ....	642	Юзефович А. П.....	424
Шарабрин С. В. ....	570, 708	Шлеева М. О.....	467	Юльметова Л. Н. ....	529
Шарипова З. О. ....	289	Шмаков Н. А.....	21	Юрова Е. В.....	629
Шарипова М. Р.....	202, 662	Шмаков С. В. ....	397	Юрченко Ю. А.....	678
Шарков С. Д.....	56	Шмаров М. М. ....	399	Юферова А. К.....	119, 305
Шарлаева Е. А. ....	704	Шмидт Е. А.....	719	Яббаров Н. Г. ....	345
Шарова Е. И.....	34, 529	Шмурак В. И.....	100	Яковлев А. Н.....	398
Шаршов К. А. ....	419	Шоева О. Ю. ....	159, 601	Яковлев И. А.....	323
Шастина Н. С.....	303	Шойхет Я. Н. ....	630	Яковлева О. В. ....	598, 660, 677
Шашкина С. С. ....	264	Шораева К. А.....	60, 441	Яковчук Е. В. ....	421, 455
Шаяхметов Е. А.....	441	Шорохова И. А. ....	298	Якупова Р. Д.....	306
Шаяхметова Л. Ш.....	710	Шошмина А. М. А.....	54	Якуш Е. А.....	57
Швалов А. Н. ....	428, 597	Штиль А. А. ....	697	Яловая А. И.....	512
Швед Н. А. ....	566, 612	Штокало Д. Н.....	92	Ямпольская Д. С.....	355
Швейгерт И. В. ....	482	Штомпель А. С. ....	720	Ямпольский И. В.....	153
Шевела А. И.....	555	Штылев Г. Ф. ....	300	Ямщиков П. С.....	58, 544, 567
Шевелева М. П. ....	204	Шувалов А. В. ....	480	Яньшолле Л. В.....	714
Шевченко А. Р.....	290	Шувалова Е. Ю.....	480	Яровая О. И.....	272, 308, 431
Шелемба А. А.....	705, 707	Шулепова Ю. Е.....	721	Ярулина Д. Р.....	677
Шелковникова В. Н.....	143, 162, 264, 292	Шульгина И. С.....	425	Ястребова Е. С.....	322
Шемякин И. Г. ....	156, 642	Шульман И. А.....	469	Яхин И. Р.....	154
Шепелев Н. М.....	565	Шуляк А. П. ....	626	Яштубаева А. Д. ....	165
Шершнева Д. С.....	712	Шумаков Д. В. ....	346	Ященко С. В.....	414, 428
Шестопалов А. М.....	419	Шумская Н. В. ....	270		
Шефер А. А.....	714	Шустова Е. Ю.....	421, 455		
		Шыныбекова Г. О. ....	723		
		Щеглов Б. О. ....	55		
		Щеглова Е. С.....	74, 724		

## СОДЕРЖАНИЕ

## РАЗДЕЛ I. БИОИНФОРМАТИКА

<b>Адамовская А. В.</b> РЕКОНСТРУКЦИЯ И АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ВНЕШНЕГО ПУТИ АПОПТОЗА ПРИ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С .....	3
<b>Аксенова Д. С.</b> ПОИСК И АНАЛИЗ SNP В РЕЦЕПТОРЕ ЛЕПТИНА .....	4
<b>Алрхмун С., Альшевская А. А., Жукова Ю. В., Лопатникова Ю. А., Перик-Заводский Р. Ю., Юдкин Д. В., Матвеева А. К., Сенников С. В.</b> ВЛИЯНИЕ TNF НА ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ K562 С НОКАУТОМ РЕЦЕПТОРА 2-ГО ТИПА К TNF .....	5
<b>Боброва Л. А., Дерюшева Е. И., Литгус Е. А.</b> ЛЕКАРСТВЕННАЯ ПАНЕЛЬ ЛИГАНДОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БАЗЫ ДАННЫХ <i>DRUGBANK</i> , СПОСОБНЫХ МОДУЛИРОВАТЬ ЕГО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С АМИЛОИДНЫМ $\beta$ -ПЕПТИДОМ .....	7
<b>Богданова Е. А., Тычинин Д. И., Новоселецкий В. Н.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СТРУКТУР КОМПЛЕКСОВ ACE2 И RBD S-БЕЛКА КОРОНАВИРУСОВ И ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ НА АФФИННОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ .....	8
<b>Bratchikov S. S., Bagaev A. V.</b> HETEROGENEITY OF STROMAL CELL POPULATIONS IN TUMOR MICROENVIRONMENT AT THE LEVEL OF RNA EXPRESSION .....	10
<b>Бубнова А. Н., Зубрицкий А. В., Камионская А. М.</b> ПОИСК СТАРТОВ НАЧАЛА ТРАНСКРИПЦИИ ВБЛИЗИ ПРЕДСКАЗАННЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОМОТОРОВ РИСА И ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ОТКРЫТОСТИ ХРОМАТИНА .....	12
<b>Budkina A. Y., Kotov I. A., Khafizov K. F., Akimkin V. G.</b> VIRAL SEQUENCE IDENTIFICATION WITH VIRIDAL PIPELINE .....	13
<b>Власенкова Р. А., Козлова А. С., Акберова Н. И., Киямова Р. Г., Богданов М. В.</b> АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТЕРА ЧЕЛОВЕКА NaPi2B С ЛИГАНДАМИ .....	14
<b>Gusarov Y. S., Mikhailova A. G., Efimenko V. E., Burskaya V. O., Popadin K. Y.</b> OXIDATIVE DAMAGE IS THE SIGNATURE FOR BIRDS MITOCHONDRIAL DNA THYMINE AND GUANINE ENRICHMENT .....	16
<b>Заварзина Я. И., Кузнецов А. С., Ефремов Р. Г.</b> СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПЕПТИДОВ-МОДУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ-1 .....	17
<b>Иванова А. О., Пипия С. О., Елисеев И. Е., Залевский А. О., Терехов С. С.</b> СОЗДАНИЕ БИБЛИОТЕКИ ПРИРОДНОГО РАЗНООБРАЗИЯ АМП .....	18
<b>Ионов Н. С., Колодницкий А. С., Рудик А. В., Поройков В. В.</b> HGMMX — БАЗА ДАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА .....	20
<b>Каретников Д. И., Генаев М. А., Нестеров М. А., Шмаков Н. А., Ибрагимова С. М., Васильев Г. В., Тощакон С. В., Гавриленко Т. А., Афонников Д. А., Салина Е. А., Патрушев М. В., Кочетов А. В.</b> РЕКОНСТРУКЦИЯ И АНАЛИЗ ПАНГЕНОМА КАРТОФЕЛЯ <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> СОРТОВ СИБИРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ .....	21
<b>Киров И. В.</b> НОВЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОБИЛОМА РАСТЕНИЙ И ЕГО ДИНАМИКИ .....	22
<b>Кирьянова Т. Д., Егорова Д. О.</b> СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВОЙ СТРУКТУРЫ ВРНА1 ШТАММА <i>RHODOCOCCLUS WRATISLAVIENSIS</i> CH628 С ПОМОЩЬЮ MODELLER .....	23
<b>Кордонская Ю. В., Тимофеев В. И., Дьякова Ю. А., Марченкова М. А., Писаревский Ю. В., Ковальчук М. В.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАСТЕРА-ПРЕКУРСОРА КРИСТАЛЛОВ БЕЛКА ПРОТЕИНАЗЫ К .....	25
<b>Коренская А. Е., Матушкин Ю. Г., Лашин С. А., Клименко А. И.</b> АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА КОРРЕЛЯЦИЮ МЕЖДУ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ И УРОВНЕМ БЕЛКА, У РАЗЛИЧНЫХ ПРОКАРИОТ .....	27

<b>Коробейникова А. В., Кабиева Ш. Ш., Косенко М. Г.</b> АНАЛИЗ ГЕННЫХ СЕТЕЙ ВИТИЛИГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОНЛАЙН-ИНСТРУМЕНТОВ БИОИНФОРМАТИКИ .....	28
<b>Котов И. А., Саенко В. В., Борисова Н. И., Колесников А. А., Кондрашева Л. Ю., Тиванова Е. В., Хафизов К. Ф., Акимкин В. Г.</b> РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОЙ ИНФРАСТРУКТУРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ И ОБНОВЛЕНИЯ БОЛЬШИХ ПРАЙМЕРНЫХ НАБОРОВ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ .....	29
<b>Котова А. Д., Коваль А. П., Житнюк Ю. В., Чудаков Д. М., Кушлинский Н. Е., Щербо Д. С.</b> ОСОБЕННОСТИ ФРАГМЕНТИРОВАНИЯ СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ .....	31
<b>Кропачев А. И., Лашин С. А., Клименко А. И.</b> АНАЛИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПРИЗНАК-ОРИЕНТИРОВАННЫМ МЕТОДОМ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП .....	33
<b>Латыпова Д. К., Каньгина А. В., Шарова Е. И., Петрова Т. В., Скородумова Л. О., Лазарев В. Н.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ КАК МОДЕЛЕЙ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/cJ .....	34
<b>Лачынова М. Е., Турнаев И. И., Афонников Д. А.</b> ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЙ КОНВЕЙЕР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА СЕМЕЙСТВ ОРТОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ: ИЗУЧЕНИЕ ФОСФОЛИПАЗ А2 У ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ.....	35
<b>Lobanova V. V., Efimenko V. E., Popadin K. Y.</b> FROM ECOLOGY TO MITOCHONDRIAL GENETICS OF NEMATODES: COLONIZERS VERSUS PERSISTERS ARE MORE T RICH DUE TO THEIR HIGHER RATE OF THE MOLECULAR CLOCKS.....	36
<b>Обернихин К. И., Енькова Е. В.</b> ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ НА СТРАЖЕ ЗДОРОВЬЯ МАТЕРИ И ПЛОДА .....	37
<b>Павлов А. Д.</b> ОЦЕНКА УСЛОВИЙ ТРУДА ПЕДАГОГОВ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ.....	39
<b>Пономарева Е. С., Лаптев Г. Ю., Ильина Л. А., Калиткина К. А.</b> ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ГЛИФОСАТА НА ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ .....	41
<b>Ревва П. М., Деменков П. С., Иванисенко В. А.</b> РЕКОНСТРУКЦИЯ АНАЛИЗ ГЕННОЙ СЕТИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА КЛЕТКИ.....	43
<b>Роев Г. В., Хафизов К. Ф., Акимкин В. Г.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭФФЕКТА МУТАЦИЙ В RBD S-БЕЛКА SARS-COV-2 НА СТАБИЛЬНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ RBD + ACE2 И RBD + АНТИТЕЛО.....	44
<b>Сингх-Пальчевская Л., Шайтан А. К.</b> КЛАСТЕРИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ H2A .....	46
<b>Stolbov L., Filimonov D., Poroikov V.</b> AN APPLICATION OF SELF-CONSISTENT CLASSIFIER TO PREDICT THE INHIBITORS OF CYTOCHROMES P450.....	48
<b>Sukhanova X. V., Komissarov A. S.</b> ASSEMBLY AND ANNOTATION OF GENOMES OF ORGANISMS FROM PROTISTA TAXONOMY GROUP BASED ON PARAMECIUM AND NUCLEARIA GENERA.....	49
<b>Sukhanova X. V., Danilov L. G., Komissarov A. S.</b> DISCOVERY OF SOMATIC RECOMBINATION EVENTS IN APP AND ANALYSIS OF ITS OCCURRENCE .....	50
<b>Хоменко П. О., Ахмадуллина Ю. Р.</b> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА МИКРОЯДЕР ЛИМФОЦИТОВ .....	51
<b>Черней И. С.</b> КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ФАРМОКИНЕТИКИ И СХОДСТВА С ЛЕКАРСТВАМИ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЭФИРНОГО МАСЛА <i>ARTEMISIA ABSINTIUM</i> .....	53
<b>Шошмина А. М. А., Вяткина К. В.</b> ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОТЕОФОРМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛГОРИТМА TWISTER ДЛЯ <i>DE NOVO</i> СЕКВЕНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ .....	54
<b>Щеглов Б. О.</b> ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММ ПРИ АНАЛИЗЕ ИШЕМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕРДЦА .....	55
<b>Щербакова С. А., Евгенов И. В., Командин Д. С., Шарков С. Д., Ермоленко А. А., Цейликман Д. В.</b> ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНОГО РЕШЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО АДЪЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....	56
<b>Якуш Е. А., Ким А. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ПЕРЕНОСА МОЛЕКУЛЫ ДИОКСАДЭТА ЧЕРЕЗ ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	57
<b>Ямщиков П. С., Ларионова И. В., Кошкин Ф. А., Пьянков Д. В., Денисов Е. В.</b> СРАВНЕНИЕ NGS-ПЛАТФОРМ ILLUMINA NEXTSEQ 2000 И GENEMIND GENOLAB M НА ПРИМЕРЕ БИБЛИОТЕК 10X GENOMICS VISIUM .....	58

## РАЗДЕЛ II. БИОТЕХНОЛОГИИ

<b>Абай Ж. С., Шораева К. А., Садикалиева С. О., Джекебеков К. К., Воронина Е. П., Сырым Н. С., Касенов М. М., Еспембетов Б. А., Нурпейсова А. С. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ НОВОЙ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА КРС .....</b>	<b>60</b>
<b>Абрамова А. С., Соловьев А. А., Гарибян Ц. С. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА.....</b>	<b>62</b>
<b>Аитова А. А. ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТВОЛОВЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК .....</b>	<b>64</b>
<b>Аксенова М. С., Готовцев П. М. ФОТОБИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ НА ОСНОВЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УГЛЕРОДНОЙ ТКАНИ И ПРОВОДЯЩЕГО ГИДРОГЕЛЯ С PEDOT : PSS И ДОБАВЛЕНИЕМ НАНОТРУБОК.....</b>	<b>65</b>
<b>Aхенов-Gribanov D. V., Pereliaeva E. V., Morgunova M. M., Imidoeva N. A., Dmitrieva M. E., Belyshenko A. Y., Telnova T. Y., Vlasova A. A., Ruleva A. Y., Shelkovnikova V. N. THE METAGENOMIC COMMUNITIES OF TUBER AESTIVUM COLLECTED IN RUSSIA .....</b>	<b>67</b>
<b>Алхиреев Д. А., Зайковская А. В., Дольский А. А., Пьянков О. В., Матвеева А. К., Юдкин Д. В. УВЕЛИЧЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ DC-SIGN ПОВЫШАЕТ ПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ККГЛ В ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ .....</b>	<b>68</b>
<b>Арипов В. С., Мордвинова Е. Д., Таранин А. В., Мечетина Л. В., Карпенко Л. И., Ильичёв А. А., Волкова Н. В., Щербаков Д. Н. ПОЛУЧЕНИЕ ФАГОВОЙ БИБЛИОТЕКИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА ЛАССА.....</b>	<b>69</b>
<b>Ateiah M., Gandalipov E., Rubel M., Kolpashchikov D. M. BIPLEX BINARY DEOXYRIBOZYME ASSAY FOR DIFFERENTIATION OF BACILLUS CEREUS SPECIES .....</b>	<b>70</b>
<b>Багнюкова Д. А., Лукин А. Ю. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ FFA1 .....</b>	<b>72</b>
<b>Баженов С. В., Щеглова Е. С., Манухов И. В. ТЕМПЕРАТУРНО-ПЕРЕКЛЮЧАЕМЫЙ АУТОИНДУКТОР-РЕГУЛИРУЕМЫЙ ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР .....</b>	<b>74</b>
<b>Баклагина С. П., Алферов С. В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ METHYLORUBRUM EXTORQUENS pCM160 ПО ОТНОШЕНИЮ К МЕТАНОЛУ, ЭТАНОЛУ И ФОРМАЛЬДЕГИДУ .....</b>	<b>76</b>
<b>Бакуменко С. С., Римская Б. А., Щербина С. А., Аитова А. А., Цвеляя В. А., Агладзе К. И. РАЗРАБОТКА ПРИБОРА СО СМЕННЫМИ ГЕПАТОКАРТРИДЖАМИ ДЛЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ.....</b>	<b>78</b>
<b>Безруков А. С., Устюжанинова Л. В. РАЗРАБОТКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ.....</b>	<b>80</b>
<b>Белаш Е. А., Колосов П. В., Балабова Д. В., Беленькая С. В., Щербаков Д. Н. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕЗАВИСИМЫХ ПАРАМЕТРОВ НА ПРОДУКЦИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ЛОСЯ ДРОЖЖАМИ KLUYVEROMYCES LACTIS .....</b>	<b>82</b>
<b>Беленькая С. В., Коваль А. Д., Ельчанинов В. В., Белов А. Н., Щербаков Д. Н. РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРЛА И АПРОБАЦИЯ ПОЛУЧЕННОГО ФЕРМЕНТА ПРИ ВЫРАБОТКЕ СЫРА.....</b>	<b>84</b>
<b>Белов Д. А. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ.....</b>	<b>86</b>
<b>Березовская М. Ю., Горбенко Д. А. ОБНАРУЖЕНИЕ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ 16S РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК ESCHERICHIA COLI И ГЕНА HlgA1 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS С ПОМОЩЬЮ БИНАРНЫХ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ.....</b>	<b>87</b>
<b>Бирючкова П. Д., Литти Ю. В., Михеева Э. Р. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ И КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ОБРАЗОВАНИЯ БИОВОДОРОДА .....</b>	<b>88</b>
<b>Богачихин Д. А., Юдина Н. Ю., Козлова Т. Н. ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА БАКТЕРИИ GLUCONOBACTER OXYDANS .....</b>	<b>90</b>
<b>Борисова М. А., Игнатов К. Б., Анисименко М. С., Гаранин А. Ю., Штокало Д. Н., Помазной М. Ю., Коваленко С. П. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ХРОМОСОМНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ (ПГТ-А) МЕТОДОМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ .....</b>	<b>92</b>
<b>Бочкарева М. Д., Сеничкина Д. А., Корнаков И. А., Хасаншина З. Р., Робустова С. Э., Латыпов В. Ф. РАЗРАБОТКА ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОИНСУЛИНА ГЛАРГИН И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В БИОРЕАКТОРАХ .....</b>	<b>94</b>

<b>Брагин К. А., Попонина Е. А. МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ.....</b>	<b>96</b>
<b>Бровко Е. С., Хлебцова Л. П. ИНКАПСУЛЯЦИЯ МИКРОЧЕРЕНКОВ ХМЕЛЯ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ <i>IN VITRO</i> ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА .....</b>	<b>98</b>
<b>Budaeva M. V., Podvalny A. M., Goverdovsky D. V., Marusich E. I., Chernyshev V. S., Leonov S. V. DEVELOPMENT OF A PLATFORM AND SOFTWARE FOR OBSERVING THE PROPERTIES OF BIO-SUBSTRATES ON A MODEL SYSTEM OF NEMATODES <i>C. ELEGANS</i> .....</b>	<b>99</b>
<b>Буслаева Е. А., Хасаншина З. Р., Корнаков И. А., Робустова С. Э., Шмурак В. И., Латыпов В. Ф. РАЗРАБОТКА И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> — ПРОДУЦЕНТА ГИБРИДНОГО БЕЛКА ПРОИНСУЛИНА .....</b>	<b>100</b>
<b>Бычкова О. В. СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА КАРТОФЕЛЯ МЕТОДАМИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ.....</b>	<b>102</b>
<b>Вахрушева А. В., Кудрявцев А. В., Крючков Н. А., Фролова М. Е., Благодатских К. А., Исаев А. А., Красильников И. В. ВАКЦИНА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ «БЕТУВАКС-КоВ-2» ПРОТИВ COVID-19.....</b>	<b>103</b>
<b>Vakhtinskii V. M., Tutykhina I. L. UNIVERSAL GENETIC CONSTRUCTION FOR SECRETING EXPRESSION OF INFLUENZA HEMAGGLUTININ IN INSECT CELLS.....</b>	<b>105</b>
<b>Вдовиченко Е. В., Козловская Л. И., Лебедева С. А. ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛА ДЛЯ ЛИНИЙ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....</b>	<b>107</b>
<b>Веремченко В. С., Ханды М. Т., Куприн А. В. РАЗРАБОТКА ГРИБКОВОЙ ДИЕТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>ZOPHOBAS ATRATUS</i> ДЛЯ НУЖД БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОМЕДИЦИНЫ .....</b>	<b>109</b>
<b>Викторина О. Е., Колосова Е. А., Шаповал А. И., Щербаков Д. Н. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОРЕГУЛЯТОРНЫХ МИШЕНЕЙ В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ.....</b>	<b>111</b>
<b>Винокуров М. А., Салеева Д. В., Саламайкина С. А., Есьман А. С. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ-ХОЗЯИНА У ВИЧ-1 ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ЛИЦ.....</b>	<b>112</b>
<b>Вишневская М. В., Готовцев П. М. ФОТОБИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ, РАБОТАЮЩИЙ НА ИСКУССТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОДАХ В КАТОДНОЙ КАМЕРЕ .....</b>	<b>114</b>
<b>Власова А. В., Киров И. В., Соловьев А. А. АКТИВАЦИЯ ТРАНСПОЗОНОВ КАК НОВЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>115</b>
<b>Волкова М. В., Соколова М. О., Бояринцев В. В., Трофименко А. В., Фильков Г. И. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА ОСНОВЕ СФЕРОИДОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК.....</b>	<b>116</b>
<b>Воробьева Е. Е., Бортникова В. А. ИНДИВИДУАЛЬНОЕ ВОСПРИЯТИЕ ВКУСА СТЕВИИ У ЛЮДЕЙ.....</b>	<b>118</b>
<b>Ворона К. А., Юферова А. К., Курилов И. В. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК СУХОЖИЛИЙ КРЫС .....</b>	<b>119</b>
<b>Ворошилин Р. А., Махамбетов Э. М. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНО-КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА И ПРОЦЕССА РАСПЫЛИТЕЛЬНОЙ СУШКИ НА ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖЕЛАТИНА .....</b>	<b>120</b>
<b>Гасюк О. А., Волченко Н. Н., Лазукин А. А., Самков А. А., Худокормов А. А. ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА МИКРОБИОТУ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ.....</b>	<b>121</b>
<b>Гаямова Е. А., Ковнир С. В., Даянова Л. К., Орлова Н. А., Воробьев И. И. ИЗУЧЕНИЕ РОСТОВЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ГЕНОМНОМ НОКАУТЕ ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ <i>WAX</i>, <i>BAK1</i> И ОВЕРЭКСПРЕССИИ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО ФАКТОРА <i>BCL-2</i> И ИНДУКТОРА АУТОФАГИИ <i>BECLIN-1</i>, И РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПРОДУЦЕНТА, ПОЛУЧЕННОГО НА БАЗЕ ЭТИХ КЛЕТОК.....</b>	<b>122</b>
<b>Германова М. А., Риккинен А. Д., Ляшков П. О. ПРИМЕНЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> .....</b>	<b>124</b>
<b>Гоглова А. В., Быков А. Г., Китова А. Е., Кленова Н. А., Решетилов А. Н. МОДИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОВОДЯЩИМ ПОЛИМЕРОМ ПЭДОТ : ПСС/ПЭГДЭ В СОСТАВЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ .....</b>	<b>125</b>
<b>Головко С. Д., Устюжанинова Л. В. ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ .....</b>	<b>127</b>
<b>Горбунова Е. А., Епанчинцева А. В., Пышная И. А. ИЗУЧЕНИЕ АДСОРБЦИИ ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ НЕСООТВЕТСТВИЯ, НА НАНОЧАСТИЦАХ ЗОЛОТА .....</b>	<b>129</b>
<b>Горина С. С., Мухтарова Л. Ш., Топоркова Я. Ю., Гречкин А. Н. ЦИТОХРОМЫ КЛАНА <i>CYP74</i>: ХАРАКТЕРИСТИКА ДИКИХ И МУТАНТНЫХ ФОРМ.....</b>	<b>130</b>



Горислав А. А. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> ТРЕХ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ-АНТАГОНИСТОВ ГАСТРИН-РИЛИЗИНГ ПЕПТИДНОГО РЕЦЕПТОРА, СОЗДАНЫХ НА ОСНОВЕ БОМБЕЗИНА, ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....	132
Горчакова В. А., Дементьев Д. А., Таратынова М. О., Юзбашева Е. Ю. ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ КАНТАКСАНТИНА НА ДРОЖЖАХ <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> .....	134
Губейко А. С., Гречко В. М., Воробьева М. М. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ НЕПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ <i>E. COLI M-17</i> .....	136
Дауди Д. И., Маклаков Д. В. РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ХИТОЗАНА И НАТУРАЛЬНОГО ШЕЛКА ПАУКА ДЛЯ НУЖД ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	138
Демиденко Д. В. ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ПЕТУНИИ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕОРГАНИЗАЦИИ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА <i>IN SITU</i> В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ .....	140
Дерина Д. С., Козак С. С. ВЛИЯНИЕ РАСТВОРА ТВС НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТУШЕК ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К <i>C. JEJUNI</i> ПРИ ВОДЯНОМ ОХЛАЖДЕНИИ .....	141
Дмитриева М. Е., Шелковникова В. Н., Бельшенко А. Ю., Малыгина Е. В., Власова А. А., Аксенов-Грибанов Д. В. ОКСИФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ КАК ИСТОЧНИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ .....	143
Дмитриева М. А., Панюта А. С., Чимези К. И., Пилипенко Ю. М., Кривошапкина Е. Ф. РН-МОДЕЛИРУЮЩАЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ ПОВЯЗКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ РАН.....	144
Добрякова Н. В., Жданов Д. Д., Кудряшова Е. В. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТОВ L-АСПАРАГИНАЗЫ <i>RHODOSPIRILLUM RUBRUM</i> НА КУЛЬТУРАХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ .....	145
Доценко А. С., Савинова О. С., Рожкова А. М., Зоров И. Н., Синецын А. П. УВЕЛИЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ.....	146
Евдокимов И. Ю., Иркитова А. Н., Малкова А. В., Ширманов М. В. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ РОДА <i>BACILLUS</i> .....	147
Егорова Е. А., Сулейманова А. Д. СПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ <i>PANTOEA BRENNERI</i> К МОБИЛИЗАЦИИ ШИРОКОГО СПЕКТРА НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТОВ .....	149
Есина Т. И., Волосникова Е. А., Щербаков Д. Н., Даниленко Е. Д. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ АДЪЮВАНТОВ НА ОСНОВЕ БЕТА-ГЛЮКАНОВ ДРОЖЖЕЙ.....	150
Жолобова О. О. КОЛЛЕКЦИЯ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ ПОРОД В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> ФНЦ АГРОЭКОЛОГИИ РАН .....	151
Загитова Р. И., Синетова М. А., Ямпольский И. В., Осипова З. М. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ <i>P. LUNULA</i> .....	153
Захаров З. В., Морозов А. Н., Яхин И. Р. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕПРЕРЫВНОГО ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ИМИГЛЮЦЕРАЗЫ В РАМКАХ КОНЦЕПЦИИ <i>QUALITY BY DESIGN</i> ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК СНО .....	154
Зенинская Н. А., Марьян М. А., Рябко А. К., Карцева А. С., Силкина М. В., Комбарова Т. И., Романенко Я. О., Рогозин М. М., Шемякин И. Г., Фирстова В. В. ПОДБОР КОМБИНАЦИЙ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭФФЕКТИВНУЮ ЗАЩИТУ ПРОТИВ БОТУЛОТОКСИНА ТИПА А, МЕТОДОМ МЫШИНОЙ БИОПРОБЫ .....	156
Злотников И. Д., Данилов М. Р., Давыдова М. П., Кудряшова Е. В. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МОКСИФЛОКСАЦИНА, ЗАГРУЖЕННОГО В МАННОЗИЛИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ К МАКРОФАГАМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕННЫХ ФОРМ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ.....	157
Зыкова Т. Е., Егорова А. А., Стрыгина К. В., Шоева О. Ю., Генаев М. А., Комышев Е. Г., Бусов И. Д., Хертиг К., Герасимова С. В., Коэпфель И., Хикель Ш., Короткова А. М., Вихорев А. В., Кумлен Й., Хлесткина Е. К. НАПРАВЛЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЕНА <i>MUS2</i> , СВЯЗАННОГО С ГОЛУБОЙ ОКРАСКОЙ ЗЕРНА ЯЧМЕНЯ .....	159
Иванская Е. В., Саковина Л. В., Горленко Е. С., Вохтанцев И. П., Новопашина Д. С. ЦИКЛИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФОТОАКТИВИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9.....	160

<b>Имидоева Н. А., Переляева Е. В., Дмитриева М. Е., Шелковникова В. Н., Бельшенко А. Ю., Аксенов-Грибанов Д. В.</b> ОЦЕНКА БИОРАЗНООБРАЗИЯ И АНАЛИЗ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ.....	162
<b>Ищук С. А., Казакова А. В.</b> СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ МАССОЙ МЕНЕЕ 5 КДА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ .....	163
<b>Казакова А. В., Ищук С. А., Яштубаева А. Д.</b> ПОДБОР УСЛОВИЙ РЕФОЛДИНГА FC-FUSION БЕЛКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ДИЗАЙНА ЭКСПЕРИМЕНТА .....	165
<b>Казачкова В. С., Плеханова Ю. В., Семашко Т. В., Кленова Н. А., Решетилов А. Н.</b> ПРИМЕНЕНИЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ В СОСТАВЕ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ УСТРОЙСТВ .....	167
<b>Камалов М. И., Гарифуллин Р. И., Немтарёв А. В., Ишкаева Р. А., Эсметьева М. В., Салахиева Д. В., Абдуллин Т. И.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КОНЪЮГАТА ПОЛИАМИННОГО ЛИГАНДА С ТАРГЕТНЫМ ПЕПТИДОМ .....	169
<b>Камалов М. И., Савенкова Д. В., Киямова Р. Г., Немтарев А. В., Абдуллин Т. И.</b> ПОЛУЧЕНИЕ АМФИФИЛЬНОГО СОПОЛИМЕРА СТИРОЛА И МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИПОСОМАМИ .....	170
<b>Капустянская М. А., Быков А. Г., Решетилов А. Н., Баскаков С. А.</b> АНТИМИКРОБНЫЙ ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В АЛЬГИНАТЕ НАТРИЯ .....	171
<b>Karaseva O. S., Ozhegov G. D., Akhatova F. S., Anisimova E. A., Fakhrullin R. F., Yarullina D. R.</b> GENOME-WIDE SEQUENCING OF THE NOVEL PROBIOTIC STRAIN <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i> FCa3L.....	172
<b>Каратовская А. П., Замятина А. В., Руденко Н. В., Бровко Ф. А., Нагель А. С., Андреева-Ковалевская Ж. И., Сиунов А. В., Солонин А. С.</b> МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К БОЛЬШОМУ С-КОНЦЕВОМУ ДОМЕНУ ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ТОКСИНА II <i>BACILLUS CEREUS</i> .....	173
<b>Карпенко А. Е., Ржевская В. С., Минкина Т. М., Омельченко А. В.</b> МОДИФИКАЦИЯ КОМПоста, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ МУСОРОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕГО ЗАВОДА ....	174
<b>Кириченко А. Д., Брюшкова Е. А., Долгова А. С., Дедков В. Г.</b> РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ .....	175
<b>Kisel M. S., Svirid A. V., Gilep A. A.</b> PREPARATION OF <i>E. COLI</i> MEMBRANE FRACTION CONTAINING ACTIVE (P450) FORM OF HUMAN CYP2B6 .....	177
<b>Козлова Т. Н., Юдина Н. Ю.</b> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ <i>PARACOCCLUS YEEI</i> ВКМ В-3302 КАК ОСНОВЫ РЕЦЕПТОРНОГО ЭЛЕМЕНТА БПК-БИОСЕНСОРА .....	179
<b>Компанеец И. Ю., Невинский Г. А.</b> АНАЛИЗ ГИСТОН- И ОБМ-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ АКТИВНОСТЕЙ sIgA МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА.....	181
<b>Кононова Д. В., Антошина Д. В., Овчинникова Т. В., Баландин С. В.</b> ПОЛУЧЕНИЕ УКРОЧЕННЫХ АНАЛОГОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АЦИДОЦИНА А ИЗ <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> .....	182
<b>Кривошеина Е. И., Карташов М. Ю., Ушкаленко Н. Д., Найденова Е. В., Пьянков С. А., Терновой В. А., Локтев В. Б.</b> ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ E И NS1 ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ IgG .....	183
<b>Кукушкина В. И., Александрова Л. А., Макаров Д. А., Авданина Д. А., Жгун А. А.</b> ПОИСК НОВЫХ АНТИСЕПТИКОВ НА ОСНОВЕ 3'-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ N <sup>4</sup> -АЛКИЛ-5-МЕТИЛ-2', 3'-ДИДЕЗОКСИЦИТИДИНОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОБЪЕКТОВ КУЛЬТУРНОГО НАСЛЕДИЯ ИЗ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕИ .....	184
<b>Кулаков М. В., Ларцева Л. О., Пунгин А. В.</b> СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ <i>SILENE VACCIFERA</i> (L.) ROTH .....	186
<b>Курганский И. С., Лепехова С. А., Григорьев Е. Г.</b> ЛОКАЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ОПЕРАЦИЯХ НА ТРАХЕЕ .....	188
<b>Лаврова Д. Г., Понаморева О. Н.</b> МАТЕРИАЛЫ ТИПА «ДРОЖЖЕВЫЕ КЛЕТКИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫХ ОБОЛОЧКАХ»: СИНТЕЗ, АРХИТЕКТУРА И ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ .....	189
<b>Латипова А. Д., Прозорова И. Ш., Сысоева Е. В., Сысоева М. А.</b> АНАЛИЗ КВЕРЦЕТИНА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ <i>TRAMETES POLYZONA</i> SUB 8447059.....	191
<b>Ле-Дейген И. М., Мамаева П. В., Сафронова А. С., Скуреедина А. А., Колмогоров И. М., Кудряшова Е. В.</b> КОМБИНИРОВАННЫЕ ЛИПИДНО-ПОЛИМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ТЯЖЕЛЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ.....	193

<b>Леонова Т. И., Акатова Е. В.</b> ВЛИЯНИЕ ГИДРОФОБНОГО СУБСТРАТА НА ПРОДУКЦИЮ ГЛИКОЛИПИДНЫХ БИОСУРФАКТАНТОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ <i>RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS</i> X5 .....	195
<b>Ловдина Т. И., Аксенов А. С., Забелина С. А., Широкова Л. С.</b> «РОЗОВАЯ» ВОДА МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА СУБАРКТИКИ: ПРИЧИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ .....	197
<b>Ловдина Т. И., Широкова Л. С.</b> СПОСОБНОСТЬ К РОСТУ ИНВАЗИВНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> НА РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ ВЕЧНОМЕРЗЛЫХ ТОРФЯНИКОВ .....	199
<b>Лутфуллин М. Т., Моисеева О. Э., Марданова А. М.</b> СИНТЕЗ АУКСИНОВ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ .....	201
<b>Лутфуллина Г. Ф., Лутфуллин М. Т., Пудова Д. С., Шагимарданова Е. И., Сташевски З., Вологин С. Г., Шарипова М. Р., Марданова А. М.</b> БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА РИЗОСФЕРЫ И РИЗОПЛАНЫ КАРТОФЕЛЯ СОРТА ЖУКОВСКИЙ РАННИЙ.....	202
<b>Лыкошин Д. Д., Немашкалова Е. Л., Шевелева М. П., Свирцевская Е. В., Есипов Р. С., Дерюшева Е. И.</b> РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ, СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (rhVEGF-A165) .....	204
<b>Макаренко И. А., Булагова Л. Ф., Богданов М. В., Киямова Р. Г., Савенкова Д. В.</b> ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2B .....	205
<b>Максимкин А. В., Дайюб Т., Филиппова О. В., Ларионов Д. И.</b> АКТУАТОРЫ ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ ПОЛИМЕРОВ .....	206
<b>Мартиросян Л. Ю., Лукьянова А. Л., Мирошников К. А., Америк А. Ю.</b> ПОИСК БАКТЕРИОФАГОВ, ЭФФЕКТИВНЫХ ПРИ БОРЬБЕ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА <i>PSEUDOMONAS</i> И <i>RAOULTELLA</i> , ПОРАЖАЮЩИХ КОК-САГЫЗ ( <i>TARAXACUM KOK-SAGYZ</i> RODIN) – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА .....	207
<b>Мелконян К. К., Волченко Н. Н., Табачникова А. А., Супрун И. В., Самков А. А., Худокормов А. А.</b> ЭФФЕКТ ВНЕСЕНИЯ СПАВ НА ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА ПОЧВЕННОГО ТИПА .....	208
<b>Мельникова А. А., Киркин Р. С.</b> ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАГРУЗКИ миРНК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ НАНОЧАСТИЦ .....	209
<b>Меркульева Ю. А., Никитин В. Н., Бондарь А. А., Щербаков Д. Н.</b> ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ТРАНСГЛЮТАМИНАЗЫ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> .....	210
<b>Микушина А. Д., Елисеев И. Е.</b> СОЗДАНИЕ БИПАРАТОПНЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ ErbB3 .....	211
<b>Митько Т. В., Белова А. М., Матвеева А. Г., Басманов Д. В., Клинов Д. В.</b> БИОСЕНСОР НА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОЛНАХ В ОДНОМЕРНОМ ФОТОННОМ КРИСТАЛЛЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С БЕЛКАМИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ.....	213
<b>Мифтахов Р. А., Иконникова А. Ю., Чудинов А. В.</b> ТВЕРДОФАЗНАЯ ПЦР НА ПОЛИМЕРНОЙ ПОДЛОЖКЕ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ РЕГИСТРАЦИЕЙ.....	214
<b>Моисеева А. В.</b> ИНГИБИТОРЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ БАКТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ.....	215
<b>Мягкова Е. Р., Мартиросян Л. Ю., Мартиросян Ю. Ц.</b> ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ КОРНЕЙ <i>HAIRY ROOTS</i> КОК-САГЫЗА ( <i>TARAXACUM KOK-SAGHYZ</i> R.) И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СУЛЬФАТОВ МЕДИ И ЦИНКА НА РОСТ БИОМАССЫ КОРНЕЙ, СОДЕРЖАНИЕ КАУЧУКА И ИНУЛИНА .....	216
<b>Nazarova A. A., Madyarova E. V., Rzhchitskiy Y. A., Shishkina E. S., Gurkov A. N., Drozdova P. B., Borvinskaya E. V., Timofeyev M. A.</b> DEVELOPMENT OF AN IMPLANTABLE YEAST-BASED BIOSENSOR FOR MONITORING OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN SALMONIDS.....	218
<b>Наумова Д. А., Котлов М. И.</b> ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА ГРИБКОВОЙ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ В ПРОМЫШЛЕННО ЦЕННЫХ ДРОЖЖАХ <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> .....	219
<b>Никитин В. Н., Меркульева Ю. А., Щербаков Д. Н.</b> КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ НЕК293T-BirA ДЛЯ ПРОДУКЦИИ БИОТИНИЛИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ .....	222
<b>Николаева А. А., Лутфуллина Г. Ф., Марданова А. М.</b> МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА И ИММУНИТЕТА СЛЕПОГО КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ ПРОБИОТИКОМ НА ОСНОВЕ СПОР <i>BACILLUS SUBTILIS</i> GM5.....	223
<b>Олейник Г. А., Черноносков А. А., Коваль В. В., Баранова С. В.</b> РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ОДНОГО ИЗ ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ .....	224

<b>Петрова М. Г., Горин К. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ <i>CHLORELLA VULGARIS</i> НА ПОВЕРХНОСТНЫХ СТОЧНЫХ ВОДАХ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ СЫРЬЯ ДЛЯ БИОДИЗЕЛЯ.....	225
<b>Печенов П. Ю., Гарагуля Д. А., Летаров А. В.</b> РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА <i>L. LACTIS</i> .....	227
<b>Pogorelkina E. A.</b> EVALUATION OF THE THERMAL STABILITY OF PROTEIN-CONTAINING HYDROGELS BASED ON SODIUM ALGINATE BY CYCLIC VOLTAMMETRY.....	228
<b>Подгало Д. Д., Малинина Д. К., Костенко В. В., Парщикова Ю. В., Косс В. А., Олейников П. Д., Гуца В. В., Бусыгина Ю. С.</b> ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НОВОГО ПОДХОДА К ЛЕЧЕНИЮ СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРОЛЕМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	230
<b>Попова В. К., Ломзов А. А., Дмитриенко Е. В.</b> НЕОРГАНИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ В КАЧЕСТВЕ ЯДРА ДЛЯ ТЕРАНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ.....	232
<b>Приставка Е. О., Левчук А. А.</b> СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ УТИЛИЗАЦИИ ПЕСТИЦИДОВ.....	233
<b>Рак А. Я., Донина С. А., Забродская Я. А., Исакова-Сивак И. Н., Руденко Л. Г.</b> ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НУКЛЕОКАПСИДА SARS-CoV-2 РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ COVID-19.....	235
<b>Рассабина А. Е., Хабибрахманова В. Р., Минибаева Ф. В.</b> ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕЛАНИНОВ ДЛЯ ИХ СТАНДАРТИЗАЦИИ.....	237
<b>Рахманина А. Е., Беленькая С. В., Бондарь А. А., Щербаков Д. Н.</b> РАЗРАБОТКА ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА АРХАРА.....	238
<b>Ребус М. Е., Соловьянова Н. А., Андреева И. С., Кабилов М. Р., Сафатов А. С.</b> ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ КОККОВЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АТМОСФЕРЫ НОВОСИБИРСКА В ЗИМНИЙ ПЕРИОД.....	239
<b>Рогозина Е. А., Колодязная В. С.</b> ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ.....	241
<b>Рудомётова Н. Б., Рудомётов А. П., Фандо А. А., Ушкаленко Н. Д., Карпенко Л. И., Щербаков Д. Н.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ТРИМЕРА CRF63_02A ВИЧ-1.....	242
<b>Руснак М. В., Кондратенко А. А., Товпеко Д. В., Калужная Л. И.</b> БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ПРОДУКТА ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ.....	243
<b>Rybkin I., Humam A., Orlov M.</b> ARTIFICIALLY STRUCTURED POLYMICROBIAL AGGREGATES FOR APPLICATIONS IN PETROLEUM BIOTECHNOLOGY.....	244
<b>Sabirova Z. R., Tuama A. A., Ivankova O. V., Karamova N. S., Stasevski Z.</b> NITROGEN-FIXING POTENTIAL OF ENDORHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM POTATO PLANTS.....	245
<b>Саввина М. Т., Максимова Н. Р., Лебедев И. Н.</b> ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ГЕТЕРОЗИГОТНОГО НОСИТЕЛЬСТВА МУТАЦИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ЧАСТЫЕ РЕЦЕССИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ), С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗРАБОТАННОГО ДНК-МИКРОЧИПА НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ.....	246
<b>Садыков А. А., Ханды М. Т.</b> КУЛЬТУРА КЛЕТОК <i>RHLOJODICARPUS VILLOSUS</i> .....	247
<b>Самарская В. О., Спеченкова Н. А., Маркин Н. В., Супрунова Т. П., Завриев С. К., Калинина Н. О., Тальянский М. Э.</b> ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ дцРНК ПРОТИВ У-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ НА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЮ, НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУНИТЕТ И МЕТАБОЛИЗМ поли(АДФ-РИБОЗЫ) В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ.....	249
<b>Самохвалов А. В., Серебренникова К. В., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.</b> ПРИМЕНЕНИЕ БИОКОНЪЮГАТОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА В КАЧЕСТВЕ ТУШИТЕЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ГОМОГЕННОЙ СИСТЕМЕ ИММУНОДЕТЕКЦИИ ОХРАТОКСИНА А.....	251
<b>Селиванов П. А.</b> МАТРИКСНАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА 9 КАК ФАКТОР РЕГЕНЕРАТОРНОЙ СПОСОБНОСТИ КОЖИ У ПОСТРАДАВШИХ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ.....	253
<b>Сокольников Л. В., Бульмакова Д. С., Сулейманова А. Д.</b> ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОЛЮБИЛИЗАЦИЮ ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА ШТАММОМ <i>PANTOEA BRENNERI</i> 3.5.2.....	254
<b>Степанова А. А., Бубнов Д. М., Выборная Т. В., Хозов А. А., Кудина М. Д., Синеокий С. П.</b> КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА ПУТЕМ ОВЕРЭКСПРЕССИИ И МНОГОКОПИЙНОЙ ХРОМОСОМНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ОПЕРОНА <i>trpLED3BA</i> .....	255
<b>Степанова С. А.</b> ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ.....	257

<b>Суворова В. В.</b> ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МОРФОЛОГИЮ И СОСТАВ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ .....	258
<b>Султанов Г. Э., Данилова Ю. В.</b> СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНЫХ ШТАММОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ОТ ШТАММА <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 168.....	260
<b>Супрунчук В. Е.</b> СИСТЕМА АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА НА ОСНОВЕ ФУКОИДАНА.....	261
<b>Сухинов Д. В., Готовцев П. М., Сергеева Я. Э.</b> ОБЪЕДИНЕНИЕ СТАДИЙ СБОРА БИОМАССЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> И ОЧИСТКИ ЭКСТРАКТА С-ФИКОЦИАНИНА ПРИ ПОМОЩИ ХИТОЗАНОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ.....	262
<b>Тельнова Т. Ю., Моргунова М. М., Шашкина С. С., Власова А. А., Шелковникова В. Н., Мишарина Е. А., Аксенов-Грибанов Д. В.</b> ЗАГРЯЗНЕНИЕ АМФИПОД ОЗЕРА БАЙКАЛ АКТИВНЫМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ СУБСТАНЦИЯМИ .....	264
<b>Терещенко Т. В., Гричик Е. Л.</b> РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ МЕТОДИКИ МАССОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ КАРЛИКОВОГО КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ВСЛ-2 В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> .....	265
<b>Ткаченко А. А., Синецкий С. П., Гордеева Т. Л.</b> РАЗРАБОТКА ШТАММА <i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i> ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМАРКЕРНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ .....	267
<b>Товпеко Д. В., Кондратенко А. А., Калужная Л. И., Чернов В. Е., Нащекин А. В., Полосков А. И.</b> ИЗГОТОВЛЕНИЕ НЕИММУНОГЕННОГО НЕТОКСИЧНОГО ВЫСОКОРЕГЕНЕРАТИВНОГО БЕСКЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЕТЕРГЕНТНЫМ СПОСОБОМ .....	268
<b>Трепакова А. И., Сковпин И. В., Чуканов Н. В., Сальников О. Г., Чекменев Э. Ю., Правдивцев А. Н., Ховенер Я.-Б., Коптгюг И. В.</b> ТРЕХМЕРНАЯ ГЕТЕРОЯДЕРНАЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ ГИПЕРПОЛЯРИЗОВАННОГО ПАРАВОДОРОДОМ ФАМПРИДИНА .....	269
<b>Узбекова О. Р., Новиков В. Ю., Рысакова К. С., Шумская Н. В.</b> СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА <i>PARALITHODES CAMTSCHATICUS</i> .....	270
<b>Фандо А. А., Рудомётова Н. Б., Щербакова Н. С., Щербаков Д. Н., Фоменко В. В., Яровая О. И., Салахутдинов Н. Ф., Карпенко Л. И.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ В ОТНОШЕНИИ ENV-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1 .....	272
<b>Федина В. В., Алферов С. В.</b> СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКЕТОВ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛАККАЗ В КАТОДНОМ ПРОСТРАНСТВЕ .....	273
<b>Филатова С. И., Мартиросян Л. Ю., Мягкова Е. Р., Мартиросян Ю. Ц.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ И КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА НА МОРФОГЕНЕЗ РАСТЕНИЙ КОК-САГЫЗА ( <i>TARAXACUM KOK-SAGHYZ</i> R.) В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> .....	275
<b>Харькова А. С., Лепикаш Р. В., Лаврова Т. В., Арляпов В. А.</b> ИММОБИЛИЗАЦИЯ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ БПК И ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД .....	277
<b>Хасанова Д. И., Рудакова Н. Л.</b> ЭКСПРЕССИЯ АДАМАЛИЗИН-ПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ <i>V. PUMILUS</i> , НАХОДЯЩЕЙСЯ ПОД КОНТРОЛЕМ СИСТЕМЫ ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА DegS-DegU .....	279
<b>Хасаншина З. Р., Корнаков И. А., Латыпов В. Ф.</b> ПРИМЕНЕНИЕ ПАРАДИГМЫ <i>QUALITY BY DESIGN</i> В РАЗРАБОТКЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ .....	280
<b>Хромова Н. Ю., Епишкина Ю. М.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА И ВИТАМИН-В-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> В-2213 В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ, ИМИТИРУЮЩЕЙ ТОЛСТЫЙ КИШЕЧНИК.....	281
<b>Хуснуллина Л. Х., Хуснутдинова Д. Р., Харченко А. М., Синягина М. Н., Маркелова М. И., Абдулхаков С. Р., Григорьева Т. В.</b> ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО СОСТАВА И КОНКУРЕНТНЫХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАЦИЛЛ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА.....	283
<b>Чечкова Н. А.</b> ОСОБЕННОСТИ РОСТА <i>BACILLUS</i> spp. НА ОРГАНОМИНЕРАЛЬНОМ СУБСТРАТЕ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ.....	285
<b>Чубаров А. С., Оскорбин И. П., Филипенко М. Л., Пышный Д. В.</b> ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЦР .....	286
<b>Чудин А. А., Кудряшова Е. В.</b> ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗА ИЗ <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> – НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ШАГАСА.....	287

<b>Шавронская Д. О., Назарова Е. А.</b> ОПТИЧЕСКАЯ БИОСЕНСОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ТИТАНА ДЛЯ МОНИТОРИНГА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ МОЛОКА .....	288
<b>Шарипова З. О., Джуманазарова Х. О., Зияев Я. С., Умаров Б. Р.</b> ВЫДЕЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ АНТОГОНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ <i>BIFIDOBACTERIUM</i> SPP.....	289
<b>Шевченко А. Р., Аксенов А. С., Майорова К. А., Родичева М. А.</b> ПОЛУЧЕНИЕ КРИОГЕЛЕЙ ИЗ ТЕХНИЧЕСКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ И КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ .....	290
<b>Шелковникова В. Н., Дмитриева М. Е., Переляева Е. В., Бельшенко А. Ю., Аксёнов-Грибанов Д. В.</b> ОЦЕНКА СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА <i>STREPTOMYCES</i> .....	292
<b>Шешукова Е. В., Липскеров Ф. А., Комарова Т. В.</b> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДУЦИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ В РАСТЕНИИ.....	293
<b>Шишкин И. Ю., Мифтахов Р. А., Чудинов А. В.</b> ФОТОХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АЛЮМИНИЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ В ТЕХНОЛОГИИ ДНК-БИОЧИПОВ.....	294
<b>Shmarova A. A.</b> ESTABLISHMENT AND OPTIMIZATION OF A BIOPLATFOM BASED ON BAIKAL SKULLCAP SUSPENSION CELL CULTURE.....	296
<b>Шорохова И. А., Тарасов С. Е., Кленова Н. А., Решетилев А. Н.</b> КОМПОЗИЦИЯ ПЭДОТ : ПСС/ГРАФЕН ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В БИОСЕНСОРАХ И БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ .....	298
<b>Штылев Г. Ф., Мифтахов Р. А., Чудинов А. В.</b> ФОТОХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА «ЩЕТОЧНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ» ИЗ ГЛИЦИДИЛМЕТАКРИЛАТА В ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ.....	300
<b>Щеголькова В. О., Беленькая С. В., Балабова Д. В., Мурашкин Д. Е., Ельчанинов В. В., Щербаков Д. Н.</b> РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА КОСУЛИ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> .....	302
<b>Щелконогов В. А., Иншакова А. М., Дарнотук Е. С., Шипелова А. В., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Казаринов К. Д., Соловьева Э. Ю., Федин А. И.</b> НАНОКОНСТРУКЦИИ С ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ: ПОЛУЧЕНИЕ, АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА.....	303
<b>Юферова А. К., Курилов И. В., Ворона К. А.</b> ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИОБЛАСТОВ ЛОШАДИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЯСА <i>IN VITRO</i> .....	305
<b>Якупова Р. Д., Деревянко А. О., Славохотова А. А., Ковпак А. А., Ивин Ю. Ю.</b> КОНСТРУИРОВАНИЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ SARS-CoV-2 С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ.....	306
<b>Яровиков А. С., Казакова А. В., Кузьминых А. А., Ищук С. А.</b> КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ SDS В РЕФОЛДИНГЕ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА GLP-1 АГОНИСТА .....	308

### РАЗДЕЛ III. БИОФИЗИКА

<b>Абдуллаев С. А., Воробьева Е. С., Салеева Д. В.</b> ВЛИЯНИЕ АИКАР НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ И УРОВЕНЬ ТРАНСРЕНАЛЬНОЙ ДНК КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ.....	310
<b>Бабич П. И., Зарубин В. Н.</b> ХРОНОФИЗИОТЕРАПИЯ — НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКЕ .....	312
<b>Багрова О. Е., Белова Е. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ФУНКЦИИ И СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ И ТРЕТИЧНЫХ СТРУКТУР.....	313
<b>Бережной А. К., Слотвицкий М. М., Калинин А. И., Цвеляя В. А., Агладзе К. И.</b> СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ С УЧЕТОМ КЛЕТОЧНОЙ МОРФОЛОГИИ ДЛЯ КОРРЕКТИРОВКИ АБЛЯЦИИ .....	314
<b>Бутова К. А., Мячина Т. А., Симонова Р. А., Щепкин Д. В., Хохлова А. Д.</b> РЕГИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ NO В НАРУШЕНИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРЕДСЕРДИЙ КРЫС ПРИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ ВЕГЕТАТИВНОГО ГЕНЕЗА.....	316
<b>Быков А. С., Молчанов М. В., Пономарева Т. И., Корякин С. Н., Тимченко М. А.</b> МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ <sup>1</sup> H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ РАСЧЕТА РИСКОВ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ .....	317

<b>Выпова Е. Р., Комарова Л. Н., Купцова П. С., Берсенева А. А.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА НОРМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА.....	318
<b>Гефтер С. Д., Поспелов А. Д., Трушина Д. Б., Балалаева И. В.</b> АНАЛИЗ МОРФОТИПА И ИНВАЗИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ SKOV-3 ПРИ РОСТЕ В ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ МАТРИКСАХ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ МЫШИ .....	320
<b>Гисич А. В., Ястребова Е. С., Мальцев В. П.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВНОГО ВОЗРАСТА ЭРИТРОЦИТОВ С УЧЕТОМ ПРОЦЕССА ВЕЗИКУЛЯЦИИ .....	322
<b>Глухов С. И., Акулиничев С. В., Кузнецова Е. А., Мартынова В. В., Яковлев И. А.</b> В ОТЛИЧИЕ ОТ КОНВЕЦИОНАЛЬНОГО ПРОТОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ, ОБЛУЧЕНИЕ ВО FLASH- И УЛЬТРА-FLASH-РЕЖИМАХ В ПИКЕ БРЭГГА АКТИВИРУЕТ ПРОАПОПТОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ <i>BAH</i> И <i>PUMA</i> В КЛЕТКАХ С МУТАНТНЫМ ГЕНОМ <i>P53</i> .....	323
<b>Гольшев В. М., Пышный Д. В., Ломзов А. А.</b> ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕЦЕПТОРНОГО БЕЛКА СЛАДКОГО ВКУСА С АГЕНТАМИ, ВЫЗЫВАЮЩИМИ ОЩУЩЕНИЕ СЛАДКОГО ВКУСА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ.....	324
<b>Дениева З. Г., Батищев О. В.</b> ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА M1 ВИРУСА ГРИППА А НА СТАДИИ ЭНДОЦИТОЗА .....	325
<b>Добрынина Е. А., Зыкова В. А., Суровцев Н. В., Лактионова А. В.</b> СВЯЗЬ КВАЗИСТАТИЧЕСКОГО КОЭФФИЦИЕНТА ЖЕСТКОСТИ И ГИГАГЕРЦОВОГО МОДУЛЯ УПРУГОСТИ ГИДРОГЕЛЕВЫХ ПЛЕНОК.....	326
<b>Евсеев И. Д., Конькова Т. В., Клушина Н. В., Ромащенко А. В., Сухов Б. Г.</b> БОР-, ГАДОЛИНИЙСОДЕРЖАЩИЕ НАНОБИОКОМПЗИТЫ АРАБИНОГАЛАКТАНА ДЛЯ МНОГОКАНАЛЬНОЙ ТЕРАНОСТИКИ.....	328
<b>Ефремов Ю. М., Преснякова В. П., Зурина И. М., Котенева П. И., Кошелева Н. В., Тимашев П. С.</b> БИОМЕХАНИКА ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ.....	330
<b>Демкин В. П., Руденко Т. В., Жуковская А. А., Котловская Л. Ю., Удут В. В.</b> ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ АДГЕЗИВНО-АГРЕГАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В НАТИВНОЙ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЗОНАНСНЫХ ЧАСТОТАХ.....	331
<b>Зайцева Ю. В.</b> ВЛИЯНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА СПЕКТР КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН.....	332
<b>Zelentsova E. A., Yanshole L. V., Tsentalovic Yu. P., Sharshov K. A., Yanshole V. V.</b> THE APPLICATION OF QUANTITATIVE METABOLOMICS FOR THE TAXONOMIC DIFFERENTIATION OF BIRDS .....	333
<b>Ивонцин Л. А., Машковцева Е. В., Нарциссов Я. Р.</b> ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОЛУКАНАЛОВ $F_0F_1$ -АТФ-СИНТАЗЫ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	334
<b>Ishemgulov A. T., Letuta S. N., Tsurko D. E., Dorofeev D. V.</b> COMPARISON OF BACTERIA PHOTONACTIVATION MECHANISMS AT PULSED EXCITATION .....	336
<b>Ишкаева Р. А., Рагад А., Лайков А. В., Гарифуллин Р. И., Камалов М. И., Салахиева Д. В., Абдуллин Т. И.</b> ВЛИЯНИЕ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВОВОГО МОДИФИКАТОРА НА КЛЕТОЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ ПЕПТИДА TYR-ARG-PHE-LYS.....	337
<b>Kalganova A. I., Mikushina A. D., Eliseev I. E.</b> MODELING INFECTION CAUSED BY MULTIDRUG RESISTANT <i>P. AERUGINOSA</i> IN AGE-SYNCHRONOUS POPULATIONS OF <i>C. ELEGANS</i> .....	338
<b>Калния Я. К., Гладчук А. С., Подольская Е. П.</b> СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ СТЕАРАТОВ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ СПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ АДДУКТОВ ГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА С ХЛОРСОДЕРЖАЩИМИ КСЕНОБИОТИКАМИ .....	340
<b>Канарская М. А., Ломзов А. А.</b> ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ САМООГРАНИЧЕННЫХ РНК-КОМПЛЕКСОВ.....	341
<b>Кисаков Д. Н., Кисакова Л. А., Боргоякова М. Б., Карпенко Л. И.</b> ДОСТАВКА ДНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩЕЙ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН (RBD) SARS-COV-2, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ <i>IN VIVO</i> .....	342
<b>Кисакова Л. А., Кисаков Д. Н., Боргоякова М. Б., Карпенко Л. И.</b> ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДНК-ВАКЦИНОЙ pVAX-RBD С ПОМОЩЬЮ СТРУЙНОЙ ИНЪЕКЦИИ .....	343
<b>Клименко В. В., Богданов Ан. А., Князев Н. А., Моисеенко В. М., Богданов А. А.</b> ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ФДТ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ СТ26.....	344

<b>Клименко М. А., Сиваев И. Б., Брегадзе В. И., Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Моллаева М. Р., Чиркина М. В., Никольская Е. Д.</b> НАНОЧАСТИЦЫ PLGA С 1,2-ДИКАРБОЛЛИДОМ КОБАЛЬТА ДЛЯ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ .....	345
<b>Коваленко С. Г., Фролова Ш. Р., Попов М. А., Шумаков Д. В., Зыбин Д. И., Агладзе К. И.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИШЕМИИ НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЮ БЫСТРЫХ НАТРИЕВЫХ И МЕДЛЕННЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЙ ПЕРИОД ПРИ КОРОНАРНОМ ШУНТИРОВАНИИ .....	346
<b>Кондратенко В. Д.</b> МИКРОБИОТОМ КИШЕЧНИКА КРЫС С МЕДИКАМЕНТОЗНО ИЗМЕНЕННЫМ ТИРЕОИДНЫМ СТАТУСОМ НА ФОНЕ ИЗБЫТОЧНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ ФРУКТОЗЫ .....	348
<b>Кополева Е. А., Пельтек А.</b> РАЗРАБОТКА РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ТРИТИОЦИАНУРОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ.....	350
<b>Копылова В. С., Бороновский С. Е., Нарциссов Я. Р.</b> ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ КИСЛОРОДА И ГЛЮКОЗЫ НА ОСНОВЕ МОДЕЛИ АРТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА КРЫСЫ .....	351
<b>Корнилов Ф. Д., Савицкая А. Г., Гончарук С. А., Минеев К. С.</b> ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КАРОТИНОИД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АСТАР ПО ДАННЫМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ .....	352
<b>Косенко А. В., Цибулина А. О., Демкин В. П., Удут В. В.</b> ОЦЕНКА ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ОСНОВЕ ТЕОРИИ НЕЧЕТКИХ МНОЖЕСТВ .....	353
<b>Котихина Е. Е., Осипов Г. В., Мухина И. В.</b> ИЗМЕНЕНИЯ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЖЕЛУДОЧКОВ СЕРДЦА ПЕРЕД ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ БЛОКИРОВКОЙ ДЕПО-ЗАВИСИМОГО КАЛЬЦИЕВОГО ТОКА .....	354
<b>Кочурова А. М., Бельдия Е. А., Ямпольская Д. С., Матюшенко А. М., Копылова Г. В., Щепкин Д. В.</b> ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С НА КАЛЬЦИЕВУЮ РЕГУЛЯЦИЮ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РАЗНЫХ КАМЕРАХ СЕРДЦА.....	355
<b>Кочурова А. М., Бельдия Е. А., Набиев С. Р., Никитина Л. В., Пивоварова А. В., Матюшенко А. М., Щепкин Д. В., Копылова Г. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ ТРОПОМОДУЛИНА В РЕГУЛЯЦИИ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ .....	357
<b>Кузнецов А. С., Ефремов Р. Г.</b> ДИМЕРИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ: РОЛЬ ЛИПИДНОГО ОКРУЖЕНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ.....	358
<b>Кущова П. С., Комарова Л. Н., Выпова Е. Р., Берсенева А. А.</b> ИЗУЧЕНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ФУМАРАТА И ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА ФИБРОБЛАСТЫ ЧЕЛОВЕКА .....	359
<b>Курьянчик Т. Г., Козел Н. В.</b> ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ ПРИ РАЗНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ .....	361
<b>Курятников К. Н., Вагнер В. Д., Конев В. П., Коршунов А. С.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ЭМАЛЕВО-ДЕНТИННОГО СОЕДИНЕНИЯ ЗУБОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	363
<b>Литвинов Н. В., Соколова Л. О., Калаева Е. А., Наквасина М. А., Артюхов В. Г.</b> ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛ- $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА .....	365
<b>Малыгина Н. М., Лянгузов А. Ю., Петрова Т. А.</b> КОМБИНИРОВАННЫЙ ПОДХОД К СПЕКТРАЛЬНОМУ АНАЛИЗУ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЕЙ НА ПРИМЕРЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	366
<b>Мартиросян Л. Ю., Барашкова И. И., Мартиросян Ю. Ц., Мотякин М. В., Гольдберг В. М.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА В РАСТЕНИЯХ TARAXACUM COK-SAGHYZ R. МЕТОДОМ ЭПР-СПИНОВОГО ЗОНДА .....	368
<b>Мельникова А. А., Балдов Д. А.</b> АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ И ДОКСОРУБИЦИНА НА КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ SK-N-BE(2) И HTERT.....	369
<b>Mitin D. E., Dobrynin S. A., Petrov K. D., Kirilyuk I. A., Chubarov A. S.</b> CONTRAST AGENTS FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING BASED ON HUMAN SERUM ALBUMIN AND SPATIALLY HINDERED NITROXIDES.....	370
<b>Морева В. О.</b> МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ СПИННОГО МОЗГА НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ SOD1 МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА .....	371
<b>Морозова Е. П., Смолярова Т. Е., Ранджан Р.</b> БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ СВЕЧЕНИЯ СВЕТЛЯКОВ И НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....	372



<b>Омельченко А. Н., Игонина Т. Н., Брусенцев Е. И., Окотруб К. А., Амстиславский С. И., Суровцев Н. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫМИ ЭМБРИОНАМИ МЫШИ МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ МЕТОК.....	374
<b>Осипов А. А., Пустовалова М. В., Чигасова А. К., Воробьева Н. Ю., Кабанов Д. И., Кочетков О. А., Барчуков В. Г., Осипов А. Н.</b> ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ФОКУСОВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H2AX В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТРИТИРОВАННОЙ ВОДЫ.....	375
<b>Пешкова Д. А., Соляникова Д. Р., Головнева Е. С.</b> ВЛИЯНИЕ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ НА Фолликулярный аппарат щитовидной железы крыс в возрастном аспекте.....	377
<b>Политко М. О., Соколов Д. К., Пашковская О. А., Жеравин А. А., Григорьева Э. В.</b> МНОГОКРАТНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ПРОТЕОГЛИКАНОВ И СНИЖАЕТ СОДЕРЖАНИЕ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	379
<b>Редькин Т. С., Савюк М. О., Слепцова Е. Е., Турубанова В. Д., Ведунова М. В., Крысько Д. В.</b> ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНАЦИИ НА ОСНОВЕ ФДТ-ИНДУЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ GL261 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕТРА(АРИЛ)ТЕТРАЦИАНОПОРФИРАЗНОВ.....	381
<b>Салихова Т. И., Лайков А. В., Ишкаева Р. А., Абдуллин Т. И., Цапаева О. В., Миронов В. Ф., Немгарёв А. В.</b> ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ПРОНИКНОВЕНИЕ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МИТОХОНДРИЯМИ НОВЫХ КОНЪЮГАТОВ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ.....	382
<b>Селютина О. Ю., Кононова П. А., Поляков Н. Э.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИЦИРРИЗИНА С ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНОЙ И ТРАНСМЕМБРАННЫМ ДОМЕНОМ Е-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА МЕТОДАМИ <sup>1</sup> H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ.....	383
<b>Семенова Е. В., Белова Е. В.</b> К ВОПРОСУ О БИОАКТИВНОСТИ ХИРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	384
<b>Симонова Р. А., Бутова К. А., Мячина Т. А., Кочурова А. М., Копылова Г. В., Щепкин Д. В., Хохлова А. Д.</b> ДЕЙСТВИЕ 17β-ЭСТРАДИОЛА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРЕДСЕРДИЙ КРЫС.....	386
<b>Смолина А. В., Полегаева Д. А., Солдатова Ю. В., Савушкин М. А., Санина Н. А., Файнгольд И. И.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ПЕНИЦИЛЛАМИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ И ЕГО ВЛИЯНИЯ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ МОНОАМИНОКСИДАЗУ.....	388
<b>Суондукова А. Т., Вахрушева Е. П., Демкин В. П., Мельничук С. В., Завадовский К. В.</b> К ВОПРОСУ О СЕГМЕНТАЦИИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА.....	390
<b>Суондукова А. Т., Демкин В. П., Мельничук С. В., Завадовский К. В.</b> ОЦЕНКА ФРАКЦИОННОГО РЕЗЕРВА КРОВОТОКА МЕТОДОМ ЛОКАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ В БИФУРКАЦИЯХ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ.....	391
<b>Унгурян В. В., Бакулина А. Ю., Колосова Н. П., Даниленко А. В., Рыжиков А. Б.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОДИНАМИКИ СВЯЗЫВАНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ ВИРУСА ГРИППА С АНАЛОГОМ РЕЦЕПТОРА КОМПЬЮТЕРНЫМИ МЕТОДАМИ.....	392
<b>Фоменко М. В.</b> ТЕРМИЧЕСКАЯ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ ПРИ ПРОБОПОДГОТОВКЕ.....	393
<b>Храмова Я. И., Нефедьева Е. Э., Храмова В. Н.</b> ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО ДАВЛЕНИЯ И СТАРЕНИЯ НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОДЕРЖАНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ В ЗЕРНОВКАХ ПШЕНИЦЫ.....	394
<b>Чайка Д. Д., Толичева О. А., Коневега А. Л.</b> НОВЫЙ АНТИБИОТИК АУРАПЛАНИН ВЛИЯЕТ НА ТЕРМОДИНАМИКУ А-САЙТОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЕ.....	396
<b>Шмаков С. В., Полежаева В. А., Кондратьев В. М., Бойцов В. М., Большаков А. Д.</b> МЕХАНОПОРАЦИЯ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ СТ26 НА ПОВЕРХНОСТИ МАССИВА ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НИТЕВИДНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ, А ТАКЖЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВАЦИИ КЛЕТОК НА ИХ ПОВЕРХНОСТИ.....	397
<b>Яковлев А. Н., Грицкова А. В., Ублинский М. В., Манжурцев А. В., Ахадов Т. А., Семенова Н. А.</b> ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИЙ ТОРМОЗНОГО НЕЙРОМЕДИАТОРА ГАМК В ОТВЕТ НА КОРОТКИЙ ЗРИТЕЛЬНЫЙ СТИМУЛ, ИЗМЕРЕННЫЕ ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОННОЙ МРС.....	398

## Раздел IV. ВИРУСОЛОГИЯ

Авдони́на Е. Д., Арте́мова Э. А., Се́дова Е. С., Шма́ров М. М. ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К КОНСЕРВАТИВНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ГРИППА А ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНОЙ.....	399
Аста́нонок А. Н., Гу́зов С. А., По́лещук Н. Н. ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В-АМИЛОИДОВ ПРИ ТРАНСМИССИВНЫХ СПОНГИОФОРМНЫХ АМИЛОИДОЗАХ .....	401
Бабо́шко Д. А., Осипова И. П., Кузьмин А. И., Рожков О. А., Тотменин А. В., Флеер М. В., Гашникова Н. М. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫДЕЛЕННОГО В РАЗНЫХ РАЙОНАХ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ .....	403
Булы́чева Ю. И., Бутенко А. М., Маркина Т. А., Дзагурова Т. К., Альховский С. В. НОВЫЕ ВИРУСЫ ГРЫЗУНОВ В ЭНДЕМИЧНЫХ ПО ГЛПС РАЙОНАХ .....	405
Власенко Н. В., Кузин С. Н., Родионова З. С. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ КАК МАРКЕР НАПРЯЖЕННОСТИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ГЕПАТИТА В ( <i>HEPADNAVIRIDAE: ORTHONEPADNAVIRUS: HEPATITIS B VIRUS</i> ) (ВГВ).....	406
Гладышева А. А., Гладышева А. В. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОТИВЫ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА И БЕЛКОВ NS3, NS5 МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ФЛАВИПОДОБНОГО KINDIA TICK VIRUS И ИХ МОДЕЛИРОВАНИЕ .....	407
Гостева Т. А., Оськина О. П., Золин В. В., Солодкий В. В. ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ШТАММА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ТЕСТ-ПОВЕРХНОСТЕЙ .....	409
Готфрид Л. Г., Гашникова Н. М. СПОСОБНОСТЬ ПРОНИКНОВЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТИОФОСФАТНЫЕ МОДИФИКАЦИИ, В ПЕРВИЧНЫЕ И ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА .....	411
Деулин И. Ю., Хрипко Ю. И., Помулев В. А., Алёхин А. А., Старостин И. С., Калымбетов А. А., Хрипко О. П. ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИРКУЛЯЦИИ КОРОНАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ.....	412
Екушов В. Е., Сивай М. В., Тотменин А. В., Максименко Л. В., Осипова И. П., Налимова Т. М., Гашникова М. П., Халиков М. Р., Чокмоморова У. З., Моторов У. Т., Акматова Ж. К., Асыбалиева Н. А., Нарматова Э. Б., Бекболотов А. А., Скударнов С. Е., Остапова Т. С., Яценко С. В., Гашникова Н. М. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВГС СУБТИПА 1В НА ТЕРРИТОРИЯХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ КИРГИЗИЯ .....	414
Есьман А. С., Миронов К. О., Черкашина А. С., Саламайкина С. А., Голубева А. Г., Акимкин В. Г. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ SARS-COV-2: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРИАНТОВ ОМИКРОН И ДЕЛЬТА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ.....	415
Золотухина Н. С., Хрипко О. П., Мирошниченко С. М. ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ ЛЕЙКОЦИТОВ В МАЗКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19.....	416
Карпова Е. В., Колпакова Е. С., Зенченко А. А., Ословский В. Е., Козловская Л. И. СКРИНИНГ ПРОИЗВОДНЫХ N6-БЕНЗИЛАДЕНОЗИНА ПО СПОСОБНОСТИ ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ПОЛИОМИЕЛИТА .....	418
Колотыгин И. О., Дубовицкий Н. А., Логинова А. М., Друзяка А. В., Кабилов М. Р., Шестопалов А. М., Шаршов К. А. ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ КОРОНАВИРУСОВ У ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ.....	419
Колпакова Е. С., Карпова Е. В., Шустова Е. Ю., Яковчук Е. В., Аралов А. В., Козловская Л. И. АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО КАК ИНГИБИТОРОВ РЕПРОДУКЦИИ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ <i>IN VITRO</i> .....	421
Кольцов А. Ю., Сухер М. М., Холод Н. С., Крутько С. А., Белов С. В., Кольцова Г. С. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА CD2V ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА .....	422
Кольцова Г. С., Кольцов А. Ю., Холод Н. С. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МОНОЦИТОВ ИММУНИЗИРОВАННЫХ СВИНЕЙ ПРИ ГОМОЛОГИЧНОМ ИЛИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ .....	423
Корнеев Е. В., Самойлов А. Е., Артюшин И. В., Юзефович А. П., Гладких А. С., Дедков В. Г., Сперанская А. С. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ РУКОКРЫЛЫХ, ОБИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД С 2015 ПО 2021 ГГ. ....	424
Кудров Г. А., Шиповалов А. В., Томилов А. А., Таранов О. С., Ивлева Е. К., Боднев С. А., Болдырев Н. Д., Зайковская А. В., Пьянков С. А., Шульгина И. С., Пьянков О. В., Максютков Р. А. МОРСКАЯ СВИНКА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА COVID-19 .....	425

<b>Kusakin A. V., Goleva O. V., Danilov L. G., Tsai V. V., Kalinin R. S., Glotov O. S.</b> PHYLOGENETIC ANALYSIS OF CHROMOSOMALLY INTEGRATED HUMAN HERPES VIRUSES TYPES 6A AND 6B IN RUSSIA.....	426
<b>Максименко Л. В., Сивай М. В., Тотменин А. В., Швалов А. Н., Скударнов С. Е., Остапова Т. С., Яценко С. В., Гашникова Н. М. НОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ВАРИАНТ CRF133_A6/B ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННЫЙ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ.....</b>	428
<b>Меженская Д. А., Исакова-Сивак И. Н., Руденко Л. Г. ФОРМИРОВАНИЕ IGG-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ОТВЕТА В-КЛЕТКАМИ МЕДИАСТИНАЛЬНЫХ ЛИМФОУЗЛОВ КАК ОСНОВНОЙ ЗАЩИТНЫЙ ФАКТОР ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ М2Е.....</b>	430
<b>Мордвинова Е. Д., Щербаков Д. Н., Яровая О. И. ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВИРУСА SARS-COV-2 СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ТЕРПЕНОИДОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ.....</b>	431
<b>Нефедова А. А., Елфимов К. А., Гашникова Н. М. СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РАЗВИТИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ <i>IN VITRO</i> НА ОСНОВЕ ИНФЕКЦИОННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНА ВИЧ И МОДИФИЦИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ MT-4/EGFP.....</b>	432
<b>Онвумере М. К., Толмачева А. С., Тимофеева А. М., Седых С. Е., Невинский Г. А. КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G КРОВИ ДОНОРОВ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ SPUTNIK V.....</b>	434
<b>Плотников К. О., Гладышева А. В., Чуб Е. В. РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА ХЕНДРА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ.....</b>	435
<b>Прокопенко П. И., Степанова Е. А., Чистякова А. К., Гошина А. Д., Матюшенко В. А., Кудрявцев И. В., Исакова-Сивак И. Н., Руденко Л. Г. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖИВОГО ВИРУСА ДЛЯ ОЦЕНКИ SARS-COV-2-СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ХОРЬКОВ.....</b>	436
<b>Проценко М. А., Мазуркова Н. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Лобанова И. Е., Пшеничкина Ю. А., Храмова Е. П. ПОТЕНЦИАЛ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА LAMIACEAE ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА.....</b>	438
<b>Рак А. Я., Степанова Е. А., Баженова Е. А., ИСАКОВА-Сивак И. Н., ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ МЕТОДАМИ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ.....</b>	439
<b>Садикалиева С. О., Абай Ж. С., Шаяхметов Е. А., Шораева К. А., Еспембетов Б. А., Нурпейсова А. С. МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СРЕДИ ДОМАШНИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН.....</b>	441
<b>Saenko V. V., Borisova N. I., Chanyshev M. D., Roev G. V., Nadtoka M. I., Akimkin V. G., Khafizov K. F. TEMPLATE-SWITCHING APPROACH USING RACE TO STUDY NOVEL VIRUSES.....</b>	442
<b>Свирин К. А., Кривошеина Е. И., Чуб Е. В., Карташов М. Ю. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ.....</b>	443
<b>Селезов С. Ю., Евстифеев Е. А., Остроушко А. А., Хафизов К. Ф., Акимкин В. Г. РЕАЛИЗАЦИЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ SARS-COV-2 В РАМКАХ РЕГУЛЯРНОГО МОНИТОРИНГА ГЕНОВАРИАНТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ.....</b>	444
<b>Собко О. А., Фисенко П. В. НАКОПЛЕНИЕ ФИТОВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ В УСЛОВИЯХ ОТСУТСТВИЯ ОБНОВЛЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ.....</b>	446
<b>Спиридонова Е. В., Ивлева Е. К., Шиповалов А. В., Кудров Г. А., Омигов В. В., Пьянков О. В., Таранов О. С. СРАВНЕНИЕ ТЯЖЕСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТКАНЯХ ЛЕГКИХ ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ВАРИАНТАМИ ВИРУСА SARS-COV-2 НА МОДЕЛИ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА.....</b>	448
<b>Сычев И. А., Матюшенко В. А., Исакова-Сивак И. Н., ОЧИСТКА КОРОНОВИРУСА SARS-COV-2 ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	450
<b>Токин Г. М. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ.....</b>	452
<b>Файзуллина Д. Р., Манухова Т. И., Евтушенко Е. А., Цибульников С. В., Уласов И. В., Никитин Н. А., Карпова О. В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ТЕРАПИИ САРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА.....</b>	453
<b>Чистякова А. К., Степанова Е. А., Исакова-Сивак И. Н., Руденко Л. Г. ДЕТЕКТИРОВАНИЕ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ.....</b>	454

<b>Яковчук Е. В., Шустова Е. Ю., Козловская Л. И. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В 2021–2022 ГГ. ....</b>	<b>455</b>
--	------------

#### РАЗДЕЛ V. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

<b>Абдурахманова М. М., Кулемзин С. В., Беловежец Т. Н., Рихтер В. А., Коваль О. А., Нуштаева А. А. 3D-3-МОДЕЛЬ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СОСТОЯЩАЯ ИЗ ОПУХОЛЕВЫХ, СТРОМАЛЬНЫХ И ИММУННЫХ КЛЕТОК.....</b>	<b>457</b>
<b>Адонина С. Н., Куликова Е. А., Куликов А. В., Базовкина Д. В. ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА <i>TNF</i> НА СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА .....</b>	<b>459</b>
<b>Аладьев С. Д., Политко М. О., Соколов Д. К., Григорьева Э. В. ДЕКСАМЕТАЗОН ВЛИЯЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ.....</b>	<b>460</b>
<b>Алексеева Л. А., Сенькова А. В., Зенкова М. А., Миронова Н. Л. РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНКАЗА УМЕНЬШАЕТ КОЛИЧЕСТВО МЕТАСТАЗОВ И ИЗМЕНЯЕТ ПРОФИЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК КРОВИ .....</b>	<b>461</b>
<b>Амерханова С. К., Волошина А. Д., Миргородская А. Б., Михайлов В. А., Захарова Л. Я. АНТИМИКРОБНЫЕ, ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ МОНО- И ДИКАТИОННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....</b>	<b>462</b>
<b>Асанов М. А., Понасенко А. В., Минина В. И. БИОЛОГИЯ ТЕЛОМЕР И ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЛЕГКОГО .....</b>	<b>463</b>
<b>Аулова К. С., Невинский Г. А. ОБРАЗОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ СО СПЕЦИФИЧНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ К БЕЛКУ МИЕЛИНА В МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА ЧЕЛОВЕКА .....</b>	<b>465</b>
<b>Akhmetova A., Chamoieva A., Abilova Zh., Kassymkhanova A., Akilzhanova A., Kozhamkulov U. DETECTION OF MUTATIONS IN <i>rpoB</i> GENE OF RIFAMPICIN-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF <i>M. TUBERCULOSIS</i> FROM KAZAKHSTAN .....</b>	<b>466</b>
<b>Багаева Д. И., Демина Г. Р., Никитушкин В. Д., Капрельянец А. С., Шлеева М. О. ПОИСК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ МИКОБАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩЕЙ В ОБРАЗОВАНИИ ТЕТРАМЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ КОПРОПОРФИРИНА .....</b>	<b>467</b>
<b>Байчурина И. А., Шульман И. А., Огурцов С. В., Маркелова М. И., Мухамедшина Я. О. ПРОФИЛИРОВАНИЕ МИКРОРНК В ЛИКВОРЕ ПАЦИЕНТОВ С ТРАВМАТИЧЕСКИМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ СПИННОГО МОЗГА .....</b>	<b>469</b>
<b>Бакланов И. Н., Гончаров Н. В., Ланских Д. В. ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ХРОМОСОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА <i>TP53</i> .....</b>	<b>471</b>
<b>Балыкова А. Н., Ерощенко Г. А. ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА <i>YERSINIA PESTIS</i> СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ОЧАГОВ ЧУМЫ ПРИКАСПИЯ.....</b>	<b>473</b>
<b>Бармак С. М. MLST-АНАЛИЗ ШТАММА <i>QAZSL-4 SALMONELLA ENTERICA</i> SUBSP. <i>ENTERICA</i>, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КУРИНОГО МЯСА .....</b>	<b>475</b>
<b>Бауэр И. А., Дмитриенко Е. В. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ .....</b>	<b>476</b>
<b>Бегинязова О. П., Солдатова Ю. В., Максименко О. Г., Георгиев П. Г., Тихонов М. В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ, ИНДУЦИРУЮЩИХ ТРАНС-СПЛАЙСИНГ В ЛОКУСЕ <i>MOD(MDG4)</i> У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.....</b>	<b>477</b>
<b>Берсенева А. А., Комарова Л. Н., Выпова Е. Р., Купцова П. С. ВАРИАНТЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОЖИРЕНИЯ .....</b>	<b>478</b>
<b>Бизяев Н. С., Шувалов А. В., Егорова Т. В., Торопыгин И. Ю., Шувалова Е. Ю., Евменов К. С., Алкалаева Е. З. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ФАКТОРА ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ <i>ERF1</i> .....</b>	<b>480</b>
<b>Бирулина Ю. Г., Воронкова О. В., Буйко Е. Е., Чернышов Н. А., Щербакова М. М. ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ НА РАЗВИТИЕ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ У КРЫС .....</b>	<b>481</b>
<b>Бирюков М. М., Патракова Е. А., Троицкая О. С., Милахина Е. В., Закревский Д. Э., Швейгерт И. В., Семенов Д. В., Коваль О. А. МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ .....</b>	<b>482</b>

<b>Болдырев Н. Д., Боднев С. А.</b> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗЫ Bst 3.0 ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОДГОТОВКИ К ПОЛНОГЕНОМНОМУ СЕКВЕНИРОВАНИЮ ВИРУССОДЕРЖАЩЕГО МАТЕРИАЛА.....	483
<b>Брус Т. В., Пюрвеев С. С.</b> РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ IL 8 В РЕАЛИЗАЦИИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ .....	484
<b>Булгакова А. Е., Дмитриенко Е. В.</b> ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ .....	486
<b>Буракова А. А., Кипень В. Н., Добыш О. И.</b> СОЧЕТАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАЗНЫХ ТИПОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА ....	487
<b>Буренина О. Ю., Рубцов Ю. П., Павлюков М. С., Мусатова О. Е., Зацепин Т. С., Рубцова М. П., Донцова О. А.</b> ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ТРАНСКРИПТОВ ЛОКУСА Q12.1, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАКОМ МОЗГА.....	489
<b>Бурняшева А. О., Рудницкая Е. А., Телегина Д. В.</b> ДИСБАЛАНС ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ И ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМ ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС OXYS .....	491
<b>Васильева Г. В., Новицкая К. С., Ломерт Е. В., Кригер Д. В., Тентлер Д. Г.</b> РОЛЬ ACTN4 В ПОДВИЖНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК .....	492
<b>Вдовина Ю. А., Копытцова Д. В.</b> БЕЛОК PCID2 ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С МРНК НАПРЯМУЮ <i>IN VITRO</i> .....	493
<b>Ведерникова В. О., Спиринов П. В., Широкова Е. Ю., Лебедев Т. Д., Прасолов В. С.</b> ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ВИЧ-1 УСИЛИВАЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭМЕТИНА И ХЛОРОХИНА .....	494
<b>Вершинина С. О., Духинова М. С.</b> ТРАНСКРИПЦИОННОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ НК-КЛЕТОК В МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ .....	495
<b>Virolainen P. A., Chekunova E. M., Verbenko V. N., Sizova I. A.</b> <i>LTS3</i> GENE KNOCKOUT METHOD IN <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> UTILIZING CRISPR/Cas9.....	497
<b>Вишнякова С. В., Чудинов А. В., Лапа С. А.</b> ИЗУЧЕНИЕ ВСТРАИВАНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПОЛИМЕРАЗ РАЗЛИЧНЫХ СЕМЕЙСТВ В РАСТУЩУЮ ЦЕПЬ ДНК .....	499
<b>Гаптулбарова К. А., Цыганов М. М., Ибрагимова М. К.</b> ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ .....	501
<b>Герашенко Т. С., Щеголева А. А., Воробьев Р. С., Хозяинова А. А., Родионов Е. О., Куанышева К. А., Шефер Н. А., Топольницкий Е. Б., Панкова О. В., Перельмутер В. М., Денисов Е. В.</b> ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО .....	503
<b>Гилязиева З. Е., Пономарев А. С., Ризванов А. А., Соловьева В. В.</b> ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ И МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА ТРЕХМЕРНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ МОДЕЛИ <i>IN VITRO</i> .....	504
<b>Голосова Н. Н., Матвеев А. Л., Морозова В. В., Козлова Ю. Н., Тикунова Н. В.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭНДОЛИЗИНОВ СТАФИЛОКОККОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ SA120 И STE134.....	505
<b>Горшкова А. А., Путляева Л. В., Поварова Н. В., Лукьянов К. А.</b> НОВЫЙ МЕТОД РАСШИРЯЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ, НЕ ТРЕБУЮЩИЙ ПРОТЕОЛИЗА .....	506
<b>Григорьев Я. А., Григорьева Т. А.</b> СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ОСОБЫМИ РЕЗИСТЕНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНОГО СОРТИНГА.....	508
<b>Гринвальд В. М., Деулин И. Ю., Хрипко Ю. И., Шипунов М. В., Хрипко О. П.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ГЕНА KRAS ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ.....	509
<b>Девяткин В. А., Кожевникова О. С., Фурсова А. Ж., Дербенёва А. С., Никулич И. Ф., Тарасов М. С., Румянцева Ю. В., Телегина Д. В., Колосова Н. Г.</b> АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ MTOR С РАЗВИТИЕМ НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ВМД В КОГОРТЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ .....	510
<b>Джалилова Д. Ш., Силина М. В.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У СТАРЫХ КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ .....	511
<b>Джугашвили Е. И., Яловая А. И., Рекеда И. А., Тамкович С. Н.</b> ОПУХОЛЕ-АССОЦИИРОВАННЫЕ MIR-24 И MIR-101 В СОСТАВЕ ЭКСОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ И АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ .....	512

<b>Долгашева Д. С., Здерева Е. А., Цыденова И. А., Гаптулбарова К. А., Ибрагимова М. К., Невская К. В., Литвяков Н. В., Першина А. Г. МЕХАНИЗМЫ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕСТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО СТВОЛОВЫХ .....</b>	<b>513</b>
<b>Должикова О. А., Мещанинова М. И., Новопашина Д. С. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ АПТАМЕРОВ С КЛАСТЕРАМИ БОРА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ .....</b>	<b>515</b>
<b>Дронова Т. А., Бабышкина Н. Н., Слонимская Е. М., Чердынцева Н. В. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА I ТИПА И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ГОРМОНПОЗИТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....</b>	<b>516</b>
<b>Дубовиченко М. В., Бобков Г. А., М. Батса, Колпащиков Д. М. МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ НОКДАУНА ГЕНОВ.....</b>	<b>517</b>
<b>Дудников М. В., Меркулов П. Ю., Соловьев А. А., Киров И. В. ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРАНСПОЗИЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА.....</b>	<b>519</b>
<b>Евменов К. С., Пустогаров Н. А., Пантелеев Д. Ю., Алкалаева Е. З. ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ФУНКЦИЙ SSB БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ T4 И T5.....</b>	<b>520</b>
<b>Елизарьев Н. А. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХЛОРОФИЛЛИНА .....</b>	<b>521</b>
<b>Елизова К. Д., Тарасенко Т. А. РОЛЬ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА TIM17:23 ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ В ПРОЦЕССЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>.....</b>	<b>523</b>
<b>Ермаков Е. А., Меламуд М. М., Балахонова Е. А., Степанов Г. А., Невинский Г. А., Бунева В. Н. КОНЦЕНТРАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ: СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И МЕТА-АНАЛИЗ ДАННЫХ.....</b>	<b>525</b>
<b>Ермолюк А. А., Авданина Д. А., Хайрова А. Ш., Лопатин С. А., Жгун А. А. АНАЛИЗ ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА ГРИБОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ХИТОЗАНОМ ИЗ <i>HERMETIA ILLUCENS</i>. .....</b>	<b>526</b>
<b>Жаглин Д. А. СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ SkQ1 НА ФОНЕ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА.....</b>	<b>527</b>
<b>Желанкин А. В., Юльметова Л. Н., Шарова Е. И. ВЛИЯНИЕ ПРЕ-АНАЛИТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОФИЛИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОРНК ПЛАЗМЫ: СОВРЕМЕННОЕ ВИДЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ И СОБСТВЕННЫЙ ОПЫТ .....</b>	<b>529</b>
<b>Жменя В. М., Гулая В. С., Пенькова А. О., Кумейко В. В. ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ГЛИОМ С ИНДУЦИРУЕМЫМИ МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ IDH1 И TP53 .....</b>	<b>530</b>
<b>Zhuravlev A. M., Golovanov A. B., Shafiullina R. R., Aksenov V. V., Ivanov I. V. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF ALOX15.....</b>	<b>532</b>
<b>Загрядская Ю. А., Охрименко И. О. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ COVID-19 И БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА.....</b>	<b>533</b>
<b>Захаркина А. Д., Гервас П. А., Чердынцева Н. В., Ахмедов А. Д., Козлов В. В., Коваленко С. П., Шаманин В. А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА EGFR В ДНК ПЛАЗМЫ ПАЦИЕНТОВ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЁГКОГО МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ.....</b>	<b>535</b>
<b>Здерева Е. А., Цыганов М. М., Ибрагимова М. К. ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....</b>	<b>536</b>
<b>Зенина А. Д., Григорьева Т. А. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ .....</b>	<b>537</b>
<b>Зернов Н. И., Мелентьева Д. М., Унанян Л. С., Попугаева Е. А. ПРОИЗВОДНОЕ ДИЗАМЕЩЕННОГО ПИПЕРАЗИНА СТАБИЛЬНО В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ВОССТАНАВЛИВАЕТ УТРАТУ СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ .....</b>	<b>538</b>
<b>Зинченко Н. Д., Савиновская Ю. И., Ермаков М. С., Нуштаева А. А., Кулигина Е. В., Семенов Д. В. ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ РНК В КЛЕТКАХ НЕК293 ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ДНРНК GAS5 ЧЕЛОВЕКА.....</b>	<b>540</b>
<b>Иванова Э. Д., Мартынова Н. Ю., Терёшина М. Б., Зарайский А. Г. ЭФФЕКТЫ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ AG1 И AGR2 В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ У ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ И МИГРАЦИИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРАХ КЕРАТИНОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА .....</b>	<b>541</b>
<b>Indyuhova E. N., Arisov M. V., Maximov V. I., Azarnova T. O. CORRECTION OF LIPOPEROXIDATION PROCESS INTENSITY IN CHICKS DURING TREATMENT OF DERMANYSSOSIS.....</b>	<b>543</b>

Казакова Е. О., Ямщиков П. С., Патышева М. Р., Казакова А. Д., Тарасова А. С., Афанасьев С. Г., Стегний В. Н., Ларионова И. В., Кжышкowska Ю. Г. ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ NANOSTRING GEOMX ДЛЯ АНАЛИЗА ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ И ОБОДОЧНОЙ КИШКИ.....	544
Калиновский А. П., Логашина Ю. А., Андреев Я. А., Королькова Ю. В. ПОИСК НОВЫХ ПРИРОДНЫХ МОДУЛЯТОРОВ ИОННОГО КАНАЛА TRPV3.....	545
Калымбетов А. А., Деулин И. Ю., Хрипка Ю. И., Шипунов М. В., Хрипка О. П. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ПРИ ОПУХОЛЯХ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЦИЙ .....	546
Kislova A. V., Sviridov P. S., Pozhitnova V. O., Fefelova E. I., Gadzhieva E. P., Voronina E. S., Zheglo D. G. MOLECULAR MAPPING OF CHROMOSOME BREAKS REVEALED THREE LARGE FRAGILE GENES SPECIFIC TO INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS .....	548
Козлова Т. А., Тюменцев М. А., Рудницкая Е. А., Стефанова Н. А. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS .....	549
Kolesnichenko S. I., Kadyrova I. A., Korshukov I. V., Ye. Kolesnikova A., Barkhanskaya V. I., Babenko D. B. SARS-COV-2 DETECTION USING MALDI-TOF AND MACHINE LEARNING APPROACH .....	550
Конина Д. О., Спарбер П. А., Вяхирева Ю. В., Филатова А. Ю., Скоблов М. Ю. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК ЧЕЛОВЕКА LINC00493.....	552
Корниенко Т. Е., Захаренко А. Л., Николин В. П., Попова Н. А., Филимонов А. С., Лузина О. А., Рогачев А. Д., Охина А. А., Салахутдинов Н. Ф., Лаврик О. И. СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ИНГИБИТОРА ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1) В СОЧЕТАНИИ С ТОПОТЕКАНОМ (ИНГИБИТОРОМ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ 1) НА МОДЕЛЬ ОПУХОЛИ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС <i>IN VIVO</i> .....	553
Короленья В. А., Севостьянова К. С., Гаврилов К. А., Шевела А. И., Филипченко М. Л., Сметанина М. А. РОЛЬ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕЦИДИВЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВЕНОЗНОГО РЕФЛЮКСА.....	555
Корюков М. А., Кечин А. А., Филипченко М. Л. NGS-ПАНЕЛЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА.....	557
Кропачева Н. О., Мещанинова М. И. КОНЪЮГАТЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С АДРЕСУЮЩИМИ ЛИГАНДАМИ, СОДЕРЖАЩИЕ КИСЛОТОЛАБИЛЬНУЮ ФОСФАМИДНУЮ СВЯЗЬ .....	559
Кузьмичев П. К., Охрименко И. С., Волынский П. Е., Лесовой Д. М., Корнилов Д. А., Загрядская Ю. А., Камынина А. В., Арсеньев А. С., Ефремов Р. Г., Бочаров Э. В. D-ЭНАНТИОМЕРНЫЙ ПЕПТИД, РАЗРАБОТАННЫЙ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, ДИНАМИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С АМИЛОИДОГЕННЫМ УЧАСТКОМ МЕМБРАНОСВЯЗАННОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ $\beta$ -АМИЛОИДА.....	561
Kulikova A. V., Eldeeb A. A., C. Patra, Kolpashchikov D. M. DETECTION OF NUCLEIC ACID BASED CANCER MARKERS INSIDE THE CELL .....	562
Купцов Н. С., Корниенко М. А., Беспятовых Д. А., Городничев Р. Б., Климина К. М., Веселовский В. А., Шитиков Е. А. РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ ВИДА <i>STARNULOCOCOCUS AUREUS</i> , ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУЛЕНТНЫМ БАКТЕРИОФАГОМ СЕМЕЙСТВА <i>HERELLELVIRIDAE</i> .....	564
Курочкина А. О., Шепелев Н. М., Рубцова М. П., Донцова О. А. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ МАТРИЧНОЙ РНК .....	565
Ланских Д. В., Белоусов А. С., Гринченко А. В., Швед Н. А., Кумейко В. В. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТРИКСНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВ .....	566
Ларионова И. В., Ямщиков П. С., Ракина М. А., Казакова Е. О., Виллерт А. Б., Коломиец Л. А. ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ .....	567
Липницкая М. А., Цыбко А. С. ЭФФЕКТ ЦЕНТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА (BDNF) НА ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ С АУТИСТИЧЕСКИ-ПОДОБНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ .....	568
Литвинова В. Р., Рудомётов А. П., Шарабрин С. В., Рудомётова Н. Б., Новопашина Д. С., Карпенко Л. И. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК, КОДИРУЮЩИХ GFR, ЗА СЧЕТ ВКЛЮЧЕНИЯ В ИХ СОСТАВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ И ОПТИМИЗАЦИИ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЕЙ .....	570

<b>Любина А. П., Терехова Н. В., Волошина А. Д., Амерханова С. К., Татаринов Д. А., Мионов В. Ф.</b> ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОНИЕВЫХ СОЛЕЙ НА РЕГУЛЯЦИЮ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ .....	571
<b>Малова Е. А., Баженов М. А., Пышная И. А.</b> ПРОТОКОЛ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИДОФОСФАТОВ.....	572
<b>Mamontova E. M., Clément M. J., Sukhanova M. V., Joshi V., Lavrik O. I., Pastré D.</b> RNA-RECOGNITION MOTIF OF FUSED IN SARCOMA (FUS) IS INVOLVED IN THE REGULATION OF PARP1 ACTIVITY AND REVEALS SPECIFIC INTERACTION WITH POLY(ADP-RIBOSE) .....	573
<b>Маркелова М. И., Хуснутдинова Д. Р., Сенина А. М., Синягина М. Н., Шакирова Г. Ф., Абдулхаков С. Р., Колесникова И. В., Шагалеева О. Ю., Лямина С. В., Захаржевская Н. Б., Григорьева Т. В.</b> ПОЛИМОРФИЗМ RS1050152 АССОЦИИРОВАН С СОСТАВОМ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА.....	574
<b>Маслова А. А., Назарова Е. Л.</b> ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОВ <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> И <i>BRAF</i> ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ .....	576
<b>Машков Е. И., Гайдученко Е. С.</b> ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ ( <i>MICROTUS ARVALIS</i> ) ПО ФРАГМЕНТУ ГЕНА <i>CYT B</i> В БЕЛАРУСИ .....	578
<b>Меднова И. А., Бойко А. С.</b> ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СЫВОРОТОЧНОГО ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА .....	580
<b>Меламуд М. М., Ермаков Е. А., Невинский Г. А., Бунева В. Н.</b> СВЯЗЬ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ АУТОАНТИТЕЛ И ИХ КАТАЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ.....	582
<b>Меркульева Ю. А., Исаева А. А., Несмеянова В. Н., Волкова Н. В., Арипов В. С., Шаньшин Д. В., Волосникова Е. А., Боргоякова М. Б., Щербаков Д. Н.</b> СТРУКТУРА И СВОЙСТВА RBD SARS-COV-2, ПОЛУЧЕННОГО В КЛЕТКАХ СНО-К1 ПРИ МОНОСЛОЙНОМ И СУСПЕНЗИОННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ .....	583
<b>Миннуллина Л. Ф., Халиуллова Г. И., Марданова А. М.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>RTX</i> -ТОКСИНА <i>MORGANELLA MORGANII</i> .....	584
<b>Миронова М. В., Горюнова О. В., Голубева И. С., Садовская Я. О.</b> СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	586
<b>Мисорин А. К., Сабиров А. Х., Азарян А. Д., Водопьянова Т. А., Легоцкий С. А., Гордеев А. А., Доронин А. Н., Соловьев В. В., Карбышев М. С.</b> РАЗРАБОТКА АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С РЕЦЕПТОРАМИ CD47 И PD-L1 ДЛЯ ТЕРАПИИ PD-L1+ ОПУХОЛЕЙ.....	587
<b>Можаровская Л. В.</b> СКРИНИНГ R-ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ <i>PINUS SYLVESTRIS</i> К МИКРОМИЦЕТУ <i>FUSARIUM SP.</i> .....	588
<b>Молобекова К. А.</b> ЭФФЕКТ АМИСУЛЬПРИДА НА ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТАУ-БЕЛКА В МОЗГЕ КРЫС <i>OXYS</i> .....	589
<b>Молчанов В. Г., Егоров А. Е., Новиков В. Ю., Новожилов Н. М., Молочков Н. В., Тимченко М. А.</b> НОВЫЙ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА.....	590
<b>Мосина Л. Д., Милейко А. Г.</b> НАРУШЕНИЕ КООРДИНАЦИИ ДВИЖЕНИЯ У МЫШЕЙ ДИКОГО ТИПА ВСЛЕДСТВИЕ ПОЯВЛЕНИЯ ТРЕВОЖНОГО ПОВЕДЕНИЯ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРИЕМЕ МЕМАНТИНА .....	592
<b>Moskaliuk V. S., Kozhemyakina R. V., Ilchibaeva T. V., Tarasiuk A. V., Kulikov A. V., Naumenko V. S., Kulikova E. A.</b> THE GENOTYPE EFFECT ON STRIATAL-ENRICHED PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE (STEP) EXPRESSION IN RATS. BDNF MIMETIC GSB-106 INFLUENCE ON BEHAVIOR AND STEP IN AGGRESSIVE AND TAME RATS.....	594
<b>Моторина А. О., Гавриш М. С., Митрошина Е. В., Бабаев А. А.</b> НАРУШЕНИЕ МИТОФАГИИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ И СТРАТЕГИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ.....	595
<b>Мошкин А. Д., Охлопкова О. В., Маслов А. А., Карташов М. Ю., Андреева И. С., Малышев Б. С., Трегубчак Т. В., Швалов А. Н., Астахова Е. М., Терновой В. А., Сафатов А. С., Белан Б. Д.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В СОСТАВЕ АЭРОЗОЛЕЙ ЗАПАДНОСИБИРСКОГО РЕГИОНА .....	597
<b>Муллакаева А. И., Салихзянова А. Ф., Богатова К. С., Яковлева О. В.</b> АНАЛИЗ ТРЕВОЖНО-ФОБИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ СИНДРОМА РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА.....	598



<b>Mungalov R. V., Turchaninova M. A., Chudakov D. M.</b> SINGLE-COPY EXPRESSION OF T CELL RECEPTORS' LIBRARY .....	599
<b>Муханова М. А., Тоцкий И. В., Шоева О. Ю.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГЕНА <i>ANT25</i> И ЕГО РОЛЬ В СИНТЕЗЕ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ И В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ.....	601
<b>Неклесова М. В.</b> ПОЛУЧЕНИЕ АНТИ-CD87 CAR Т-ЛИМФОЦИТОВ И ОЦЕНКА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ <i>IN VITRO</i> .....	602
<b>Нефёдова В. В., Кочурова А. М., Матюшенко А. М.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ КАРДИОМИОПАТИЙ, ВЫЗВАННЫХ ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ ТРОПОМИОЗИНА .....	605
<b>Никифоров К. А.</b> ОБНАРУЖЕНИЕ ШТАММА <i>YERSINIA PESTIS</i> БИОВАРА INTERMEDIUM НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН.....	606
<b>Новикова Д. С., Пожарский А. А., А. Сагайдак</b> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОРТИНГА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ FRET-БИОСЕНСОРОВ.....	608
<b>Nour M. A. Y., Kurbanov G. F., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M.</b> BINARY ANTISENSE CONSTRUCTS MODULATED BY THE CONCENTRATION OF CANCER MARKERS .....	609
<b>Одегова Е. И., Тимофеева А. М.</b> АНАЛИЗ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУБФРАКЦИЙ АНТИТЕЛ ПЛАЗМЫ КРОВИ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ .....	611
<b>Онищенко М. С., Швед Н. А.</b> ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИНАМИКА КЛЕТОК ГЛИОМЫ C6 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВЫХ МАТРИКСАХ .....	612
<b>Онян А. В., Рудакова А. А., Ковтун О. Г.</b> ПРЕОДОЛЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ КАТИОННЫХ ПЕПТИДОВ.....	615
<b>Орешко А. С., Родный А. Я., Ильчибаева Т. В., Базовкина Д. В., Науменко В. С.</b> ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА 5-HT7 РЕЦЕПТОРА В СРЕДНЕМ МОЗГЕ НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА BDNF И ЕГО РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ.....	617
<b>Оскорбин И. П., Новикова Л. М., Филипенко М. Л.</b> СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБРАТНЫХ ТРАНСКРИПТАЗ В ОТ-LAMP .....	618
<b>Охальников А. Д., Гавриш М. С., Бабаев А. А.</b> ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МИКРОГЛИИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА .....	620
<b>Панюта А. С., Тюлин А. А., Пилипенко Ю. М., Кривошапкина Е. Ф.</b> ИНГИБИРОВАНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ПУТЕМ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ МИРНК В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РАНАХ .....	622
<b>Парамоник А. П., Седых С. Е., Невинский Г. А.</b> АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОРНК НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКСОСОМ МОЛОКА КОРОВЫ.....	623
<b>Patra C., Smirnov V., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M.</b> AN shRNA RELEASING DNA NANOSTRUCTURE WITH ONCOMARKER-DEPENDENT ACTIVATION .....	624
<b>Пенькова А. О., Шуляк А. П., Ланских Д. В., Жменя В. М., Кумейко В. В.</b> ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЦНС.....	626
<b>Погодина Е. С., Расторгуева Е. В., Юрова Е. В., Белобородов Е. А., Сугак Д. Е.</b> ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К РАДИАЦИОННОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ.....	629
<b>Подлесных С. В., Колтышева П. И., Тищенко Е. Д., Шойхет Я. Н., Лазарев А. Ф., Авдалян А. М., Вихлянов И. В., Беленинова И. А., Синкина Т. В., Джонстон С. А., Шаповал А. И.</b> ИММУНОСИГНАТУРЫ РЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСА И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	630
<b>Попов Д. Ю., Казаков М. С., Шитикова Е. Ю., Винокуров А. Ю.</b> ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МАТРИКСЕ И ТРАНСМЕМБРАННОМ ПРОСТРАНСТВЕ МИТОХОНДРИЙ.....	631
<b>Просекина Е. А., Карпов А. Е., Федоруцева Е. Ю., Артемьева А. С.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БЕЛКА DDAN1 В ПРОЦЕССАХ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ НА МОДЕЛИ КУЛЬТУР КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ .....	632
<b>Прохорова Д. В., Толстова П. О., Купрюшкин М. С., Довыденко И. С., Переверзев И. М., Пышный Д. В., Степанов Г. А.</b> ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ В СТРУКТУРЕ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 <i>IN VITRO</i> .....	633

<b>Пукаева Н. Е., Овчинников Р. К., Кухарский М. С. АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ДЛИННУЮ НЕКОДИРУЮЩУЮ РНК NEAT1_1 ЧЕЛОВЕКА .....</b>	<b>634</b>
<b>Пырников А. С., Милокова Н. А., Полховская Е. С., Соловьев А. А. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НА ГРУППУ ГЛЮТЕНИНКОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ <i>BX</i> У <i>TRITICOSECALE</i> .....</b>	<b>635</b>
<b>Раковская А. В., Пчицкая Е. И., Безпрозванный И. Б. РОЛЬ ДИНАМИЧЕСКИХ ТУБУЛИНОВЫХ МИКРОТРУБОЧЕК В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ АКТИВАТОРА ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ STIM2.....</b>	<b>637</b>
<b>Родионов И. В., Проскурнина Е. В., Ершова Е. С., Савинова Е. А., Краевая О. А., Трошин П. А., Каменева Л. В., Вейко Н. Н., Костюк С. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДЕЛОВ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ХЛОРСОДЕРЖАЩЕГО ПРОИЗВОДНОГО ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ФЛЭЧ .....</b>	<b>639</b>
<b>Родный А. Я., Молобекова К. А., Кондаурова Е. М., Стефанова Н. А., Колосова Н. Г., Науменко В. С. ВЛИЯНИЕ АМИСУЛЬПРИДА НА ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТАУ-БЕЛКА У КРЫС OXYS — МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА.....</b>	<b>641</b>
<b>Романенко Я. О., Силкина М. В., Карцева А. С., Марьин М. А., Шкуратова М. А., Макарова М. А., Шемякин И. Г., Фирстова В. В. ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА C6D7-RBD, СПЕЦИФИЧНОГО К RBD-ДОМЕНУ S-БЕЛКА ВИРУСА SARS-COV-2.....</b>	<b>642</b>
<b>Рудомётов А. П., Рудомётова Н. Б., Ломзов А. А., Ильичёв А. А., Карпенко Л. И. СВОЙСТВА ПОЛИЭПИТОПНЫХ ИММУНОГЕНОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМБИНАЦИИ ИЗВЕСТНЫХ ЭПИТОПОВ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ВИЧ-1 АНТИТЕЛ.....</b>	<b>643</b>
<b>Рыченкова О. О., Старикова М. С., Жаглин Д. А. ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ SKQ1 НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ .....</b>	<b>645</b>
<b>Рябинина М. В., Зелинский А. А., Рубель А. А., Чернов Ю. О. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ФОРМИРОВАНИЮ АМИЛОИДОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОНКОГЕНЕЗОМ.....</b>	<b>646</b>
<b>Савенкова Д. В., Булатова Л. Ф., Камалов М. И., Абдуллин Т. И., Макаренко И. А., Киямова Р. Г., Богданов М. В. ВЫДЕЛЕНИЕ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2B С ПОМОЩЬЮ АМФИФИЛЬНОГО ПОЛИМЕРА СМА .....</b>	<b>647</b>
<b>Савина Е. Д., Снытникова О. А., Колосова Н. Г., Телегина Д. В., Центалович Ю. П. ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛОМА ГИППОКАМПА ПРИ РАЗВИТИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ .....</b>	<b>649</b>
<b>Савинова Е. А., Проскурнина Е. В., Ершова Е. С., Родионов И. В., Краевая О. А., Трошин П. А., Каменева Л. В., Вейко Н. Н., Костюк С. В. ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО ПРОИЗВОДНОГО ФУЛЛЕРЕНА F3-52 НА УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ ФЛЭЧ.....</b>	<b>650</b>
<b>Савиновская Ю. И., Нуштаева А. А., Савельева А. В., Морозов В. В., Рябчикова Е. И., Кулигина Е. В., Рихтер В. А., Семенов Д. В. ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА АКТИВАЦИЮ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ A549.....</b>	<b>651</b>
<b>Савюк М. О., Гавриш М. С., Ведунова М. В., Митрошина Е. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КИНАЗ IKK<math>\beta</math>, JAK2, FLT4 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ КАЛЬЦИЕВУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГИППОКАМПА.....</b>	<b>653</b>
<b>Сагайдак А. В., Ворона С. В., Григорьева Т. А. МЕТОД ДЕКОНТАМИНАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР.....</b>	<b>654</b>
<b>Сайткулова М. М., Брызгунова О. Е., Остальцев И. А., Лактионов П. П., Коношенко М. Ю. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ МИКРОРНК МОЧИ КАК МАРКЕРЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ КАСТРАЦИОННО-РЕЗИСТЕНТНОГО РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....</b>	<b>655</b>
<b>Саковина Л. В., Вохтанцев И. П., Новопашина Д. С. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ СОЗДАНИЯ СПЕЦИФИЧНОЙ И РЕГУЛИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9.....</b>	<b>656</b>
<b>Саламайкина С. А., Миронов К. О., Корчагин В. К., Есьман А. С., Карнаушкина М. А., Литвинова М. М. ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....</b>	<b>657</b>
<b>Салеева Д. В., Воробьева Е. С., Раева Н. Ф., Абдуллаев С. А., Засухина Г. Д. АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК У МЫШЕЙ С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ ЛЬЮИСА ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ .....</b>	<b>659</b>
<b>Салихзянова А. Ф., Митрухина О. Б., Яковлева О. В. ИЗМЕНЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ СИНДРОМА РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА.....</b>	<b>660</b>

<b>Самарина С. А.</b> ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕТЕРОМЕРОВ 5-НТ <sub>7</sub> И TrkB РЕЦЕПТОРОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ И ОЦЕНКА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЗНАЧИМОСТИ.....	661
<b>Санникова А. В., Шарипова М. Р., Шакиров Е. В., Валеева Л. Р.</b> РОЛЬ TRFL БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР У НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ ГРУППЫ BRYOPHYTA .....	662
<b>Санькова М. В., Николенко В. Н.</b> МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЗНАЧИМОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПАНЕТА .....	663
<b>Сарачина А. Е., Дроздова П. Б., Дагбаев М. Д., Ильин Г. Д., Тимофеев М. А.</b> РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОТИПОВ БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОД <i>EULIMNOGAMMARUS VITTATUS</i> В БАЙКАЛЬСКОМ БАССЕЙНЕ .....	665
<b>Сенина А. М., Хуснутдинова Д. Р., Маркелова М. И., Булыгина Е. А., Сиягина М. Н., Куприянова О. В., Нигматуллина Л. Ш., Сынбулатова Г. Э., Муллахметова А. Ф., Григорьева Т. В.</b> АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ЕЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СОДЕРЖАНИЯ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ.....	666
<b>Сикамов К. В., Кудрявцева А. А., Манухов И. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ АНТИРЕСТРИКЦИОННОГО БЕЛКА ARDV ПРОТИВ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ I ТИПА В ГОМОЛОГИЧНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМАХ .....	668
<b>Синицкий М. Ю., Синицкая А. В., Шишкова Д. К., Понасенко А. В.</b> ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС АССОЦИИРОВАН С ФОРМИРОВАНИЕМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА .....	670
<b>Скотникова А. К., Куликова Е. А., Москалюк В. С., Куликов А. В., Базовкина Д. В.</b> ЭФФЕКТ НОКАУТА ГЕНА <i>TNF</i> НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА ПРИ ВВЕДЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА .....	672
<b>Слепцова Е. Е., Турубанова В. Д., Редькин Т. С., Савюк М. О., Ведунова М. В., Крысько Д. В.</b> АНАЛИЗ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ МОЛЕКУЛ DAMP'S ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКИ-ИНДУЦИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ГЛИОМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕТРААРИЛТЕТРААНОПОРФИРАЗИНОВ.....	673
<b>Смирнова Е. О., Горина С. С., Ланцова Н. В., Топоркова Я. Ю., Гречкин А. Н.</b> ФЕРМЕНТЫ КЛАНА <i>CYR74</i> ЛАНЦЕТНИКОВ: <i>BRANCHIOSTOMA FLORIDAE</i> , <i>B. BELCHERII</i> И <i>B. LANCEOLATUM</i> .....	676
<b>Сорокина Д. М., Яруллина Д. Р., Яковлева О. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ МИКРОБИОТЫ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА .....	677
<b>Столбунова К. А., Охлопкова О. В., Кабве Э., Давидюк Ю. Н., Степанюк М. А., Юрченко Ю. А., Хайбуллина С. Ф.</b> ВЫЯВЛЕНИЕ РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЛПС В МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ .....	678
<b>Студеникина А. А., Михайлова Е. С., Вараксин Н. А., Архипов С. А., Аутеншлюс А. И.</b> МАРКЕР ПРОЛИФЕРАЦИИ KI-67 И ЦИТОКИНЫ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....	679
<b>Третьякова М. С., Бокова У. А., Фролова А. А., Алифанов В. В., Андрюхова Е. С., Иванюк Е. Е., Чердынцева Н. В., Перельмутер В. М., Денисов Е. В.</b> МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОРТРЕТ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ <i>IN VIVO</i> .....	680
<b>Турбанова В. Д., Савюк М. О., Слепцова Е. Е., Редькин Т. С., Ведунова М. В., Крысько Д. В.</b> АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ФЕРРОПТОТИЧЕСКИ-ИНДУЦИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ГЛИОМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RSL3.....	681
<b>Филатова А. А., Алексеева Л. А., Зенкова М. А., Миронова Н. Л.</b> ФИБРОБЛАСТЫ И ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ИЗМЕНЯЮТ СВОЙ ФЕНОТИП ПРИ ОБРАБОТКЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК .....	682
<b>Фишер М. С., Булыгин А. С., Хантакова Ю. Н., Курилин В. В., Терещенко В. П., Сенников С. В.</b> ИНДУКЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ T-КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРА CDK8/19 AS2863619 .....	683
<b>Флоринская В. С., Корниенко И. В., Арамова О. Ю., Безуглова О. С.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФУЛЬВОКИСЛОТ ЧЕРНОЗЕМА ЮЖНОГО НА ПОЛИМЕРАЗНУЮ ЦЕПНУЮ РЕАКЦИЮ ПРИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ .....	685
<b>Фролова А. А., Геращенко Т. С., Патышева М. Р., Брагина О. Д., Чердынцева Н. В.</b> ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА МОНОНУКЛЕАРОВ В ДИНАМИКЕ ХИМИОТЕРАПИИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....	686
<b>Фролова А. А., Ибрагимова М. К., Цыганов М. М.</b> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК В ГЕНАХ СИСТЕМЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРЕПАРАТАМ ПЛАТИНЫ НА МОДЕЛЯХ <i>IN VITRO</i> .....	687
<b>Хасанов Т. А., Осмаков Д. И., Андреев Я. А., Козлов С. А.</b> ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДА НОВОГО СТРУКТУРНОГО КЛАССА ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ, МОДУЛИРУЮЩЕГО РАБОТУ КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО КАНАЛА 1A-ТИПА .....	689

<b>Хромова А. С., Коваль А. П., Благодатских К. А., Щербо Д. С.</b> СИСТЕМЫ ПЦР-РВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДНК В ОБРАЗЦАХ сцДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ .....	690
<b>Hussein Z., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M.</b> ANTENNA-EQUIPPED DEOXYRIBOZYME MACHINE FOR ULTRA-SENSITIVITY AMPLIFICATION-FREE DETECTION OF SARS-COV-2 RNA.....	692
<b>Цибульников С. В., Файзуллина Д. Р., Степень М. Ю., Анискин Д. А., Киргизов К. И., Романцова О. М., Калинин С. А., Недорубов А. А., Красавин М. Ю., Тимашев П. С., Уласов И. В.</b> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ КАРБОАНГИДРАЗ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТЕРАПИИ САРКОМЫ ЮИНГА .....	694
<b>Цыденова И. А., Цыганов М. М., Ибрагимова М. К., Нуштаева А. А., Литвяков Н. В.</b> МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ИЗ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ .....	695
<b>Цымбал С. А., Змитриченко Ю. Г., Штиль А. А.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ МЕДЬОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА <i>IN VIVO</i> .....	697
<b>Черенко В. А., Седых С. Е., Невинский Г. А.</b> ДОСТАВКА ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В КЛЕТКИ MCF-7 ПРИ ПОМОЩИ ЭКЗОСОМ МОЛОКА ЛОШАДИ.....	699
<b>Chernova L. S., Vishnyakov I. E., Kayumov A. R.</b> SMALL HEAT SHOCK PROTEIN ALIBPA FROM MYOPLASMA <i>ACHOLEPLASMA LAIDLAWII</i> PREVENTS THE FORMATION OF AMYLOID STRUCTURES IN THE BIOFILM MATRIX .....	700
<b>Чернюк Д. П., Полозова М. И., Балтынк Г., Безпрозванный И. Б.</b> БЕЛОК BCL-2 СНИЖАЕТ ЧИСЛО АМИЛОИДНЫХ БЛЯШЕК В МОЗГЕ 5FAD МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА.....	701
<b>Чиграй М. Е., Раковская А. В., Пчицкая Е. И., Безпрозванный И. Б.</b> ФОРМИРОВАНИЕ КОНТАКТОВ МЕЖДУ КЛАСТЕРАМИ БЕЛКА BCL2 И КЛАСТЕРАМИ РЕЦЕПТОРА IP3 В МЫШИНЫХ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ <i>IN VIVO</i> .....	703
<b>Чиркова В. Ю., Шарлаева Е. А., Беленькая С. В., Щербаков Д. Н.</b> КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕКОМБИНАНТНОЙ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-CoV-2.....	704
<b>Шаньшин Д. В., Подлесных С. В., Колосова Е. А., Гаськова Е. Д., Шелемба А. А., Шаповал А. И.</b> ПОИСК И ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОРА STLA-4Fc С ПЕПТИДОМ-БЛОКАТОРОМ .....	705
<b>Шаньшин Д. В., Борисевич С. С., Протопопова Е. В., Локтев В. Б., Щербаков Д. Н.</b> КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПА ШИРОКОРЕАКТИВНОГО АНТИТЕЛА 10N10.....	706
<b>Шапрова О. Н., Шаньшин Д. В., Шелемба А. А., Шаповал А. И.</b> ПОИСК СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЛОКАТОРОВ РЕЦЕПТОРА STLA-4 Т-ЛИМФОЦИТОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АФФИННОСТИ .....	707
<b>Шарабрин С. В., Рудомётов А. П., Карпенко Л. И., Ильичёв А. А.</b> СПОСОБ ОЧИСТКИ МРНК ОТ ПРИМЕСЕЙ ДЦРНК .....	708
<b>Shararova G. R., Tarasova G. R., Fazleeva G. M., Islamova L. N., Kalacheva N. V.</b> WATER-SOLUBLE POLYOL-МЕТАНОFULLERENE REDUCES EXCESSIVE NEUTROPHILS-INDUCED ROS IN THE HUMAN BLOOD <i>EX VIVO</i> .....	709
<b>Шаяхметова Л. Ш., Тимофеева А. М., Седых С. Е., Невинский Г. А.</b> АНАЛИЗ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К S-БЕЛКУ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ДОНОРОВ .....	710
<b>Шершнева Д. С., Беловежец Т. Н., Кулемзин С. В.</b> СОЗДАНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ АФФИННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВАРИАНТОВ SPIKE-БЕЛКА SARS-COV-2 С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ .....	712
<b>Шефер А. А., Яньшолё Л. В., Григорьева А. Е., Тамкович С. Н.</b> РАЗЛИЧИЯ ПРОТЕОМА ЭКЗОСОМ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПСЕВДОНОРМАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ И КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗЛИЧНЫМ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ .....	714
<b>Шингарёва А. А., Лапа С. А., Чудинов А. В.</b> РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЕДИНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ НЕСКОЛЬКИХ ВИРУСНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА.....	715
<b>Ширшикова Т. В., Богомольная Л. М.</b> ВКЛАД ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ MASAB-2 В ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК <i>SERRATIA MARCESCENS</i> SM6.....	717
<b>Шитик Е. М., Прокопов Д. Ю., Шалик И. К., Юдкин Д. В.</b> РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДЕЛЕЦИИ CGG ПОВТОРА В ГЕНЕ <i>FMR1</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9.....	718
<b>Шмидт Е. А., Смирнов Е. Ю., Барлев Н. А.</b> TG2 И МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ В КОНТЕКСТЕ ОТВЕТА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК .....	719
<b>Штомпель А. С., Сидорова М. К., Калабушева Е. П., Ульянов С. В., Разин С. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЛОКУСА КЕРАТИНОВЫХ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА.....	720

---

<b>Шулепова Ю. Е., Колесникова Е. А., Куклина С. А. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....</b>	<b>721</b>
<b>Шыныбекова Г. О., Мухами Н. Н., Кожабегенов Н. С., Исабек А. У., Тагайев А. И., Кисык Т. А., Копбаева А. А., Мелисбек А. М., Червякова О. В., Орынбаев М. Б., Султанкулова К. Т. ВЫЯВЛЕНИЕ <i>COXIELLA BURNETII</i> ИЗ КЛЕЩЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН, 2021–2022.....</b>	<b>723</b>
<b>Щеглова Е. С., Баженов С. В., Манухов И. В. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ БЕЛКОВ-РЕЦЕПТОРОВ QS СИСТЕМЫ МОРСКИХ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ <i>ALIVIBRIO LOGEI</i> К СВЯЗЫВАНИЮ С ЗОХОС6-HSL, С8-HSL И ЗОНС10-HSL.....</b>	<b>724</b>
<b>Щеголева А. А., Пономарева А. А., Гервас П. А., Геращенко Т. С., Панкова О. В., Зарубин А. А., Перельмутер В. М., Чердынцева Н. В. АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ .....</b>	<b>726</b>
<b>Щеголева А. А., Воробьев Р. С., Денисов Е. В. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕЙ НЕВЫЯВЛЕННОЙ ПЕРВИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ .....</b>	<b>727</b>
<b>Юдкина А. В., Булгаков Н. А., Ким Д. В., Жарков Д. О. ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК-ПЕПТИДНЫХ СШИВОК С АП-САЙТАМИ .....</b>	<b>728</b>
<b>Указатель авторов.....</b>	<b>729</b>

Научное издание

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

Сборник тезисов

Корректоры

*М. В. Власова, Д. И. Ковалёва, С. В. Исакова, Т. А. Маркова*

*Верстка А. С. Терешкиной*

*Обложка Е. В. Неклюдовой*

Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 95,5. Усл. печ. л. 88,8.

Заказ № 214.

Издательско-полиграфический центр НГУ  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.





# ОРЕНБИО — ОТРАСЛЕВОЙ КОМПЛЕКС МЕРОПРИЯТИЙ

исследования | инновации | развитие бизнеса в сфере lifescience

**Площадка открытых коммуникаций OpenBio – комплекс мероприятий, посвященных коммерциализации идей и развитию бизнеса в сфере наук о жизни.**



**НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ ВИРУСОЛОГОВ,  
БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ  
И БИОИНФОРМАТИКОВ**



**ФОРУМ ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ**



**ВЫСТАВКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ  
И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ**



**НАУКА БЕЗ ГРАНИЦ:  
ДЕТСКИЙ ФОРУМ, ART SCIENCE, ЭСТЕТИКА МИКРОМИРА**

ISBN 978-5-4437-1362-5



9 785443 713625



LIFESCIENCE EVENT